



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement  
Département de Formation Doctorale Biologie - Agronomie-Environnement  
Secteur Biologie Forestière

**Thèse**  
présentée pour l'obtention du titre de  
**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I**  
en Biologie Forestière  
par **Jean-Luc JANY**

**Le champignon ectomycorhizien *Cenococcum geophilum* Fr. dans les  
hêtraies lorraines : structure génétique des populations et rôle dans  
la résistance à la sécheresse des racines superficielles du hêtre**

Soutenue publiquement le 26 Mars 2002

Membres du jury :

|               |                                                               |                                                                                                                                        |
|---------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Président :   | M. Jean-Michel FAVRE                                          | Professeur, Université Henri Poincaré., Nancy I                                                                                        |
| Rapporteurs : | M. Jean-Claude DEBAUD<br>M. Xavier LEROUX                     | Professeur, Université Claude Bernard, Lyon-I<br>Chargé de Recherche, INRA, Lyon                                                       |
| Examineurs :  | M. Jean GARBAYE<br>M. Jean-Marc GUEHL<br>M. Dominique LECLERC | Directeur de recherche, INRA, Nancy (Directeur de Thèse)<br>Directeur de recherche, INRA, Nancy<br>O.N.F. Direction régionale Lorraine |

---

Unité Mixte de Recherche 1136  
INRA-Nancy/Université Henri Poincaré  
« Interactions Arbres/Micro-Organismes »

*Ce travail a été réalisé grâce à une bourse de thèse co-financée  
par l'Office National des Forêts et la Région Lorraine, et par  
des crédits de recherche de l'Office National des Forêts.*

# Table des matières

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex

|              |    |
|--------------|----|
| Avant-propos | 11 |
|--------------|----|

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| <b>Introduction Générale</b> | <b>12</b> |
|------------------------------|-----------|

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Les ectomycorhizes interface fonctionnelle de l'écosystème forestier.</b> | <b>13</b> |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Structure et fonctionnement généraux d'une ectomycorhize sont désormais bien connus.</b> | <b>14</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>La mycorhize, une entité née d'une relation symbiotique.</i> | <b>14</b> |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>L'ectomycorhize : une structure et des fonctions caractéristiques de la forêt tempérée.</i> | <b>15</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Le statut hydrique des végétaux ectomycorhizés</b> | <b>17</b> |
|-------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Le statut hydrique des végétaux est largement modifié par l'ectomycorhization</i> | <b>17</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>La modification du statut hydrique du végétal par le champignon ectomycorhizien a plusieurs causes</i> | <b>18</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Les mycorhizologues ont décrit et expliqué la structure et la dynamique des populations de champignons ectomycorhiziens.</b> | <b>20</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Il est possible de décrire la structure et la dynamique des populations d'ectomycorhiziens.</i> | <b>20</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>A l'échelle d'un écosystème, il existe une dynamique temporelle et spatiale des populations de champignons ectomycorhiziens.</i> | <b>20</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Une image actuelle de la communauté des champignons ectomycorhiziens</i> | <b>23</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Etablir le lien entre diversité fonctionnelle et génétique constitue le défi principal de l'écologie des champignons ectomycorhiziens.</b> | <b>24</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                        |           |
|----------------------------------------|-----------|
| <i>Etat de l'art...et perspectives</i> | <b>24</b> |
|----------------------------------------|-----------|

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Quelle est la difficulté constituée par l'établissement de ce lien ?</i> | <b>24</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <i>Les applications en foresterie</i> | <b>25</b> |
|---------------------------------------|-----------|

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b><i>Cenococcum geophilum</i></b> | <b>25</b> |
|------------------------------------|-----------|

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Présentation</i>                                                                                                         | 25 |
| <i><u>C. geophilum</u>, trois entités</i>                                                                                   | 26 |
| <i>Le mycélium végétatif</i>                                                                                                | 26 |
| <i>Les ectomycorhizes</i>                                                                                                   | 26 |
| <i>Les sclérotes</i>                                                                                                        | 27 |
| <b><i>C. geophilum</i>, un ectomycorhizien cosmopolite.</b>                                                                 | 28 |
| <i><u>C. geophilum</u>, un large spectre d'hôtes.</i>                                                                       | 28 |
| <i><u>C. geophilum</u>, des habitats très divers.</i>                                                                       | 28 |
| <b><i>C. geophilum</i> : relations trophiques</b>                                                                           | 29 |
| <i>Nutrition et métabolisme du phosphore chez <u>C. geophilum</u></i>                                                       | 29 |
| <i>Nutrition et métabolisme azotés chez <u>C. geophilum</u></i>                                                             | 29 |
| <i>Nutrition et métabolisme carbonés chez <u>C. geophilum</u></i>                                                           | 30 |
| <b><i>C. geophilum</i> : résistance au stress hydrique</b>                                                                  | 30 |
| <i><u>C. geophilum</u> est résistant à la sécheresse.</i>                                                                   | 30 |
| <i>Résistance à d'autres stress</i>                                                                                         | 31 |
| <i>Quel peut être le déterminisme de la résistance au stress hydrique de <u>C. geophilum</u> et de ses ectomycorhizes ?</i> | 31 |
| <b><i>C. geophilum</i> : pas de sexe, mais une grande diversité génétique.</b>                                              | 33 |
| <i>Premier ectomycorhizien Loculoascomycète</i>                                                                             | 33 |
| <i>Une diversité génétique étonnante...</i>                                                                                 | 33 |
| <i>...pour un champignon asexué</i>                                                                                         | 34 |
| <i>La structuration des populations de <u>C. geophilum</u> est méconnue.</i>                                                | 34 |
| <i>La biodiversité fonctionnelle de <u>C. geophilum</u></i>                                                                 | 35 |
| <b>La Hêtraie Lorraine</b>                                                                                                  | 35 |

|                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Le hêtre dans la Région Lorraine</i>                                                                                                                                                                                            | 35        |
| <i>Le cortège ectomycorhizien de la hêtraie Lorraine</i>                                                                                                                                                                           | 35        |
| <i>La hêtraie Lorraine et <u>C. geophilum</u></i>                                                                                                                                                                                  | 36        |
| <b>Les objectifs de l'étude</b>                                                                                                                                                                                                    | 36        |
| <b><i>Premier Volet : Caractérisation génétique des populations de <u>Cenococcum geophilum</u> au sein de la hêtraie Lorraine.</i></b>                                                                                             | <b>37</b> |
| <b>Chapitre I : Amplification PCR spécifique de l'ITS de <i>Cenococcum geophilum</i>, détection d'un champignon affine aux genres <i>Hymenoscyphus</i> et <i>Phialophora</i> associé aux ectomycorhizes de <i>C. geophilum</i></b> | <b>38</b> |
| <b>Introduction</b>                                                                                                                                                                                                                | <b>40</b> |
| <b>Matériels et Méthodes</b>                                                                                                                                                                                                       | <b>41</b> |
| <i>Détermination des amorces CGITS1 et CGITS2</i>                                                                                                                                                                                  | 41        |
| <i>Prélèvement d'ectomycorhizes et de sclérotés</i>                                                                                                                                                                                | 42        |
| <i>Mises en culture et isolements</i>                                                                                                                                                                                              | 42        |
| <i>Souches fongiques de référence</i>                                                                                                                                                                                              | 42        |
| <i>Extraction de l'ADN et amplification PCR</i>                                                                                                                                                                                    | 43        |
| <i>Séquençage</i>                                                                                                                                                                                                                  | 43        |
| <i>Réalisation du dendrogramme phylogénétique</i>                                                                                                                                                                                  | 43        |
| <i>Détermination des amorces Kinha1 et Kinha2</i>                                                                                                                                                                                  | 44        |
| <b>Résultats</b>                                                                                                                                                                                                                   | <b>44</b> |
| <i>Amplification de CGITS à partir de mycélias de référence et à partir d'ectomycorhizes de <u>C. geophilum</u></i>                                                                                                                | 44        |
| <i>Amplification de CGITS à partir des isolats dérivant de la mise en culture de sclérotés ou d'ectomycorhizes de <u>C. geophilum</u></i>                                                                                          | 44        |

*Relations phylogénétiques des isolats dérivant de la mise en culture  
d'ectomycorhizes de C. geophilum basées sur le séquençage de l'ITS de l'ADNr  
nucléaire* 45

*Amplification d'un produit PCR avec les amorces Kinha1 et Kinha2 partir  
d'extraits d'ADN ectomycorhizes de C. geophilum* 46

**Discussion** 46

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chapitre II : <i>Cenococcum geophilum</i> populations show a high degree of<br/>genetic diversity in beech forests</b> | <b>49</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

**Introduction** 51

**Materials and Methods** 52

*Beech stands, experimental soil cores and sampling pattern* 52

*Preparation of sclerotia and ectomycorrhizas* 52

*Preparation of fungal cultures* 53

*DNA analyses* 53

*DNA extraction.* 53

*RAPD* 53

*RAPD data analysis.* 53

*Sequencing of SCAR1* 55

*Design of C. geophilum ITS specific primers* 55

*PCR/RFLP.* 55

**Results** 56

*Genetic variability of C. geophilum assessed by sclerotia typing* 56

*PCR/RFLP of the rDNA ITS.* 56

*DNA sequencing of SCAR1* 57

*Genetic variability of C. geophilum assessed by typing of ectomycorrhizal tips* 57

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Discussion</b>                                                                        | <b>58</b> |
| <i>Genetic variability of <u>C.geophilum</u> at the regional scale</i>                   | <b>59</b> |
| <i>Spatial distribution of genotypes of <u>C.geophilum</u> at the inter-stand scale</i>  | <b>59</b> |
| <i>Spatial distribution of genotypes of <u>C. geophilum</u> at the intra-stand scale</i> | <b>60</b> |
| <b>Acknowledgments</b>                                                                   | <b>61</b> |
| <b>Annexe IV-1 (profils de PCR/RFLP)</b>                                                 | <b>62</b> |

|                                                                                                                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b><i>Deuxième Volet : Caractérisation physiologique des populations de <u>Cenococcum geophilum</u> au sein de la hêtraie Lorraine, résistance au stress hydrique de <u>C. geophilum</u>.</i></b> | <b>63</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chapitre III : Respiration activity of ectomycorrhizas from <i>Cenococcum geophilum</i> and <i>Lactarius sp.</i> in relation with soil water potential in beech forests</b> | <b>64</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction</b>                                      | <b>66</b> |
| <b>Materials and Methods</b>                             | <b>68</b> |
| <i>Experimental stands and sampling patterns</i>         | <b>68</b> |
| <i>Ectomycorrhiza preparation</i>                        | <b>68</b> |
| <i>C. geophilum isolates</i>                             | <b>69</b> |
| <i>Drought stress induction on C. geophilum isolates</i> | <b>69</b> |
| <i>Microradiorespirometry assay</i>                      | <b>69</b> |
| <i>Determination of ergosterol content by HPLC</i>       | <b>70</b> |
| <i>Data analysis</i>                                     | <b>70</b> |
| <b>Results</b>                                           | <b>70</b> |
| <i>Soil parameters</i>                                   | <b>70</b> |
| <i>Ectomycorrhizal types</i>                             | <b>71</b> |

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Potential respiration activity (PRA) of <u>C.geophilum</u> under <u>in vitro</u> drought stress conditions</i> | 71 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| <i>Potential respiration activity (PRA) of ectomycorrhizas</i> | 71 |
|----------------------------------------------------------------|----|

|                   |    |
|-------------------|----|
| <b>Discussion</b> | 72 |
|-------------------|----|

|                        |    |
|------------------------|----|
| <b>Acknowledgments</b> | 74 |
|------------------------|----|

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Annexe VI-1 (système expérimental d'induction du stress <i>in vitro</i>)</b> | 75 |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| <b>Annexe VI-2 (système expérimental de radiorespirométrie)</b> | 76 |
|-----------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Chapitre IV : Etude par résonance magnétique nucléaire du <math>^{13}\text{C}</math> du métabolisme carboné des champignons ectomycorhiziens <i>Cenococcum geophilum</i> et <i>Laccaria bicolor</i> en réponse au stress hydrique.</b> | 77 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                     |    |
|---------------------|----|
| <b>Introduction</b> | 79 |
|---------------------|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| <b>Materiels et Méthodes</b> | 81 |
|------------------------------|----|

|                          |    |
|--------------------------|----|
| <i>Matériel fongique</i> | 81 |
|--------------------------|----|

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| <i>Isolat de <u>C. geophilum</u></i> | 81 |
|--------------------------------------|----|

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| <i>Isolat de <u>L. bicolor</u></i> | 81 |
|------------------------------------|----|

|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| <i>Culture en routine des mycelia fongiques</i> | 81 |
|-------------------------------------------------|----|

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <i>Application du stress hydrique</i> | 81 |
|---------------------------------------|----|

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <i>Utilisation du PEG</i> | 81 |
|---------------------------|----|

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| <i>Préparation du système expérimental</i> | 82 |
|--------------------------------------------|----|

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Induction du stress hydrique 'continu' avant analyse en RMN <math>^{13}\text{C}</math> en abondance naturelle</i> | 82 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Induction du stress hydrique transitoire et marquage au <math>^{13}\text{C}</math> avant analyse en RMN <math>^{13}\text{C}</math></i> | 83 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| <i>L'analyse sensu stricto des hymétabolites carbonés solubles</i> | 83 |
|--------------------------------------------------------------------|----|

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| <i>Extraction des composés solubles</i> | 83 |
|-----------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Spectres RMN <math>^{13}\text{C}</math>.</i>                                                                                                                                                                  | 84 |
| <i>Calcul des concentrations</i>                                                                                                                                                                                 | 84 |
| <b>Résultats</b>                                                                                                                                                                                                 | 84 |
| <i>Analyse des métabolites carbonés solubles majoritaires détectés par RMN du <math>^{13}\text{C}</math> en abondance naturelle chez <u>Cenococcum geophilum</u>.</i>                                            | 84 |
| <i>Analyse RMN du <math>^{13}\text{C}</math> des composés carbonés solubles du mycélium de <u>C. geophilum</u> lors de l'assimilation de <math>[1-^{13}\text{C}]</math>glucose en l'absence de stress induit</i> | 85 |
| <i>Effet d'un stress hydrique induit sur le métabolisme du de <math>[1-^{13}\text{C}]</math>glucose chez <u>C. geophilum</u>.</i>                                                                                | 86 |
| <i>Analyse des métabolites carbonés solubles majoritaires détectés par RMN du <math>^{13}\text{C}</math> en abondance naturelle chez <u>Laccaria bicolor</u>.</i>                                                | 87 |
| <i>Analyse RMN du <math>^{13}\text{C}</math> des composés carbonés solubles du mycélium de <u>L. bicolor</u> lors de l'assimilation de <math>[1-^{13}\text{C}]</math>glucose en l'absence de stress induit.</i>  | 87 |
| <i>Effet d'un stress hydrique induit sur le métabolisme du de <math>[1-^{13}\text{C}]</math>glucose chez <u>L. bicolor</u></i>                                                                                   | 88 |
| <b>Discussion</b>                                                                                                                                                                                                | 89 |
| <i>Assimilation du glucose et flux métaboliques chez <u>C. geophilum</u> et <u>L. bicolor</u></i>                                                                                                                | 89 |
| <i>Métabolites carbonés principaux chez <u>C. geophilum</u> et <u>L. bicolor</u>.</i>                                                                                                                            | 89 |
| <i>Principales voies métaboliques chez <u>C. geophilum</u> et <u>L. bicolor</u>.</i>                                                                                                                             | 90 |
| <i>Comportements métaboliques chez <u>C. geophilum</u> et <u>L. bicolor</u> en conditions de stress hydrique</i>                                                                                                 | 93 |
| <b>Remerciements</b>                                                                                                                                                                                             | 94 |
| <b><i>Troisième Volet : Biodiversité fonctionnelle des populations de <u>Cenococcum geophilum</u> au sein de la hêtraie Lorraine</i></b>                                                                         | 95 |
| <b>Chapitre V : Activités respiratoires d'isolats mycéliens de <u>Cenococcum geophilum</u> après induction d'un stress hydrique.</b>                                                                             | 96 |
| <b>Introduction</b>                                                                                                                                                                                              | 98 |

|                                                                            |            |
|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Matériels et Méthodes</b>                                               | <b>99</b>  |
| <i>Isolats fongiques</i>                                                   | 99         |
| <i>Culture des différents isolats</i>                                      | 99         |
| <i>Induction du stress hydrique</i>                                        | 99         |
| <i>Test radiorespirométrique</i>                                           | 100        |
| <i>Mesure de la masse sèche des disques mycéliens</i>                      | 100        |
| <b>Résultats</b>                                                           | <b>100</b> |
| <i>Activités respiratoires des différents isolats</i>                      | 100        |
| <i>Evolution de l'activité respiratoire à réponse à un stress hydrique</i> | 100        |
| <b>Discussion</b>                                                          | <b>101</b> |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>Discussion générale</b> | <b>103</b> |
|----------------------------|------------|

|                                                                                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Comprendre le fonctionnement d'une communauté ou d'une population de champignons ectomycorhiziens : une tâche difficile.</b>           | <b>104</b> |
| <b>Qu'est-ce qu'une ectomycorhize de <i>C. geophilum</i> ?</b>                                                                            | <b>105</b> |
| <b>Caractérisation génétique des populations de <i>C. geophilum</i> au sein de la hêtraie lorraine</b>                                    | <b>106</b> |
| <i>Dans la hêtraie lorraine les populations de <u>C. geophilum</u> possèdent une forte variabilité génétique</i>                          | 106        |
| <i>D'où peut émaner la forte diversité génétique de <u>C. geophilum</u> ?</i>                                                             | 106        |
| <i>Les populations de <u>C. geophilum</u> semblent différenciées spatialement</i>                                                         | 108        |
| <b>Caractérisation physiologique des populations de <i>C. geophilum</i> au sein de la hêtraie lorraine, résistance au stress hydrique</b> | <b>109</b> |
| <b>Comment obtenir davantage d'informations sur la fonction et la dynamique des ectomycorhizes de <i>C. geophilum</i> ?</b>               | <b>110</b> |

|                      |            |
|----------------------|------------|
| <b>Bibliographie</b> | <b>112</b> |
|----------------------|------------|

## Avant-propos

Quatre années passées au sein de feu le laboratoire de Microbiologie Forestière, aujourd'hui UMR IaM, quatre années passées à travailler, mais aussi à cohabiter d'une façon toujours harmonieuse, cela mériterait quatre années de remerciements. Mais je n'ai qu'une page.

Mes premiers mots seront pour mes deux encadrants. Je remercie très sincèrement, mon Directeur de Thèse, Jean GARBAYE, qui m'aura guidé tout au long de ma thèse et m'aura légué quelques fragments de son incroyable érudition. Je dois aussi beaucoup à Francis MARTIN, mon chef de laboratoire, parce qu'il a toujours su me tendre la main lors des moments cruciaux de mon travail.

Mes autres mots, non moins sincères, non moins chaleureux, vont à tous les gens qui constituent l'équipe des 'microbes' et aux personnes extérieures qui m'ont apporté leur aide. En particulier un merci : résonant à Patrice RUBINI ; raisonné à Frédéric LAPEYRIE ; béat à Béatrice PALIN ; admiratif à Sébastien DUPLESSIS ; complice à Patricia LUIS ; beaucoup à Jésus DIEZ ; enchanté à Joanne BERTAUX ; chanté à Franck DITENGOU ; très reconnaissant à Marc-André SELOSSE ; amical à Claude MURAT ; de bases à Christine DELARUELLE et à Anne-Grete KOHLER ; fluorescent à Pascale FREY-KLETT ; impressionné à François LE TACON ; pour tout à Céline DiBATTISTA et à Bibata Kadidia SANON ; très grand à Céline SORIN ; météorologique à Serge KLUSKA ; en couleur à Dominique VAIRELLES ; en trois dimensions à Francis COLIN ; nostalgique à Catherine VOIBLET, à Chantal BRULE, à Hubert LAGRANGE et à Oscar FERREIRA ; absurde à Yannick BAILLET ; lointain à Vincent BOIFFIN ; sylvestre à Jean-Louis CHURIN, à Patrice VION et à Daniel BOUCHARD ; sociable à Anne-Laure JAMBOIS ; pataphysique à Denis TAGU ; rayonnant à Marie-Pierre RIVIERE ; appliqué à Martina PETER et à Michel CHALOT ; aveyronnais à Monique GARDES ; à fort potentiel à Jean-Marc GUEHL ; forestier aux agents O.N.F. ; rigolo à Mirco IOTTI ; sympathique à Stéphane RIVIERE ; humble à Sofia KOTOWSKI ; idéal à Marc BUEE ; bi-équien à Patrick FRETTEINGER ; vicinal à Pierre-Emmanuel COURTY et à Nicolas ROUHIER ; financier à l'O.N.F., à la Région Lorraine et à l'INRA ; confus à tous ceux que j'ai omis.

Je terminerai par la traditionnelle dédicace : "À mes mentors, qui guidèrent ma plume. À mes amis et parents, qui consolèrent mes peines. À *Cenococcum*, qui en vaut la peine."

## Introduction Générale

### **Les ectomycorhizes : interface fonctionnelle de l'écosystème forestier**

Environ un tiers des terres émergées sont occupées par la forêt. Si celle-ci se trouve principalement localisée dans la zone intertropicale (40% de la surface forestière totale), elle recouvre également une partie des zones tempérées, boréales ou alpines. Fondamentalement, la forêt peut-être définie selon le concept des types biologiques de Raunkier (1905) où elle apparaît alors *comme une formation dominée par des phanérophytes*, plantes dont la partie végétative est ligneuse et pérenne, c'est à dire une formation d'arbres. Mais la forêt doit avant tout être envisagée en tant qu'écosystème. Il est aujourd'hui acquis que l'on ne peut pas comprendre la structure et dynamique d'une communauté végétale si l'on ignore les interactions avec les communautés animales, fongiques et microbiennes avec lesquelles elles partagent un habitat et paysage forestier. A l'heure de la prise de conscience du fort impact du *Global Change*, à l'heure où la préoccupation d'une gestion durable est de plus en plus présente chez les gestionnaires forestiers, il apparaît primordial d'appréhender au mieux la composition et le fonctionnement de l'ensemble de l'écosystème forestier. En effet, la question de la réponse des communautés forestières aux perturbations que constitue le changement climatique attendu pour les décennies proches est un enjeu puissant de la recherche en écologie. Il s'agit de perturbations qui vont entraîner des réponses fonctionnelles, des hysteresis, des modifications d'assemblage, où les théories et modèles sur les successions végétales, incluant le rôle des interactions avec les communautés animales, fongiques et bactériennes, auront un rôle puissant à jouer.

Concernant les interactions entre les communautés d'arbres et les communautés fongiques, les connaissances actuelles permettent en particulier d'affirmer que l'association symbiotique entre arbres et champignons telluriques est une règle quasi-générale et qu'elle contribue à l'établissement et à la pérennité de l'écosystème forestier de même qu'à sa productivité (Read, 1991). L'association mycorhizienne est à l'interface de la plante et du sol ; elle constitue donc un maillon essentiel dans le transfert des éléments du sol vers la plante (Smith & Read, 1997). Elle revêt ainsi un rôle fondamental dans la physiologie et la croissance des arbres. Cette association représente également un lien entre arbres : il existe des flux d'éléments carbonés, par le biais des hyphes fongiques, entre arbres ectomycorhizés d'espèces différentes (Simard *et al.* 1998). Les arbres d'une forêt sont ainsi connectés grâce à l'existence d'un réseau mycorhizien : c'est le concept de 'wood-wide web' (Helgason *et al.*, 1998). Les symbioses ectomycorhiziennes sont ainsi de véritables synapses au sein de l'écosystème forestier.

L'importance des associations symbiotiques a longtemps été négligée. Certains auteurs (*Newtonian ecological school*) considérant la trop grande divergence existant entre les deux symbiotes, pensaient que l'entité symbiotique était incapable de s'adapter aux conditions fluctuantes d'un écosystème. Aujourd'hui, les progrès de la biologie moléculaire et de la génomique fonctionnelle ont déjà contribué à une meilleure compréhension du fonctionnement coordonné des deux symbiotes associés (Martin, 2001), et de nombreuses études écologiques ont montré que le rôle de la symbiose ectomycorhizienne dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers était primordial (Buscot *et al.*, 2000). La compréhension du rôle fonctionnel des communautés ectomycorhiziennes passe désormais par l'établissement d'un lien entre les études génétiques et fonctionnelles des populations de champignons ectomycorhiziens (Buscot *et al.*, 2000 ; Read, 2000 ; Dahlberg, 2001).

### **Structure et fonctionnement généraux d'une ectomycorhize sont désormais bien connus.**

*La mycorhize, une entité née d'une relation symbiotique.*

La mycorhize (Gr. *Mykes*=champignon ; *Rhyza*=racine) est un organe mixte plante-champignon. C'est Frank (1885) qui introduisit ce terme après avoir observé au niveau des racines des arbres une structure anatomique et morphologique dans laquelle étaient impliqués des *mycelia* fongiques. Cette observation le conduisit à présager de la nature symbiotique de cette association. La confirmation de l'hypothèse de Frank fut faite lors d'expériences ultérieures (Melin & Nilsson 1950). L'association mycorhizienne est une relation mutualiste (Smith & Read, 1997). Le végétal bénéficie de l'exploitation optimisée du sol par le partenaire fongique qui de son côté assure sa nutrition carbonée grâce à la phototrophie de la plante.

L'évolution conjointe des plantes et des champignons formant les mycorhizes fut initiée avec l'apparition des premières plantes terrestres, il y a 300 millions d'années (Le Tacon & Selosse, 1994). L'adaptation au milieu aérien est, semble-t-il, passée par cette association symbiotique (Selosse & Le Tacon, 1995 ; 1998). La symbiose entre racines de plantes et champignons mycorhiziens est quasiment universelle dans les écosystèmes terrestres (Smith & Read, 1997). Cette association concerne aussi bien la majorité des angiospermes et des gymnospermes que de nombreux ptéridophytes et bryophytes, et même certaines espèces d'algues (Smith & Read, 1997). Au total 95% des végétaux sont concernés par la symbiose mycorhizienne (Malloch *et al.* 1980).

**Tableau 01.** Caractéristiques des principaux types mycorhiziens (D'après Selosse, 1998).

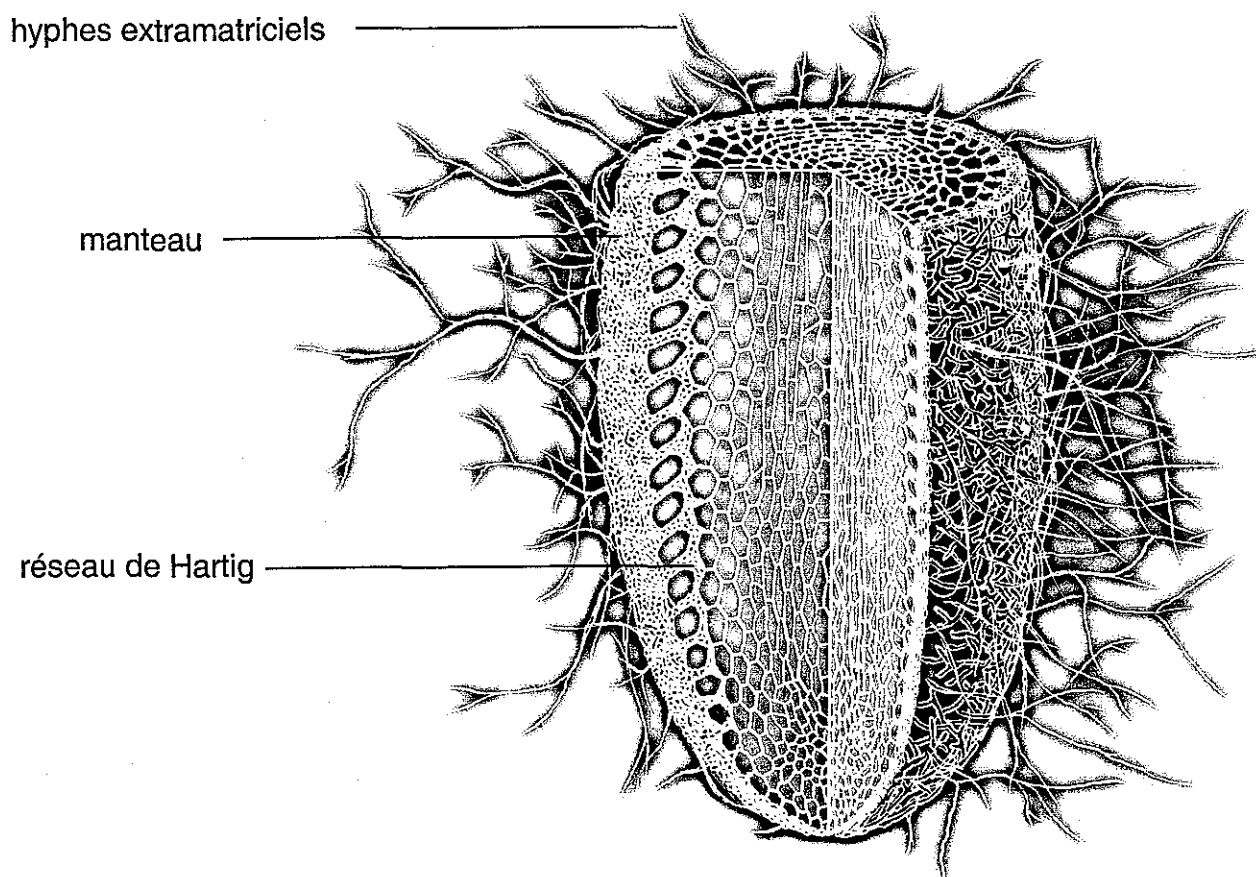
| Type morphologique                                 | Endomycorhizien<br>'vésiculo-arbusculaire'                                                           | Ectomycorhizien                                                                                         | ectendomycorhizien                                                                                                                      | Endomycorhizien<br>'à pelotons'                                                                                            |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Photobionte</b>                                 | Plus de 80% des<br>Spermaphytes et la plupart<br>des ptéridophytes                                   | Spermaphytes ligneuses et de<br>très rares Ptéridophytes                                                | Spermaphytes (certains ligneux,<br>certaines Ericales)                                                                                  | Spermaphytes (Ericacées,<br>orchidées) et certaines<br>Ptéridophytes                                                       |
| <b>Mycobionte</b>                                  | Non Septés<br><br>Glomales (Zygomycètes)<br>200 à 500 espèces                                        | Septés<br><br>Ascomycètes et<br>Basidiomycètes<br>5000 espèces au moins                                 |                                                                                                                                         |                                                                                                                            |
| <b>Structures fongiques</b>                        | Vésicules seulement ou<br>vésicules et arbuscules<br>(suçoirs ramifiés<br>intracellulaires)          | Manteau fongique autour de la<br>racine et réseau de Hartig<br>cortical, strictement<br>extracellulaire | Manteau plus ou moins épais,<br>réseau de Hartig et suçoir<br>(Monotropoïdes) ou peloton<br>(Arbutoïdes) intracellulaires<br>(variable) | Hyphe et pelotons<br>intracellulaires                                                                                      |
| <b>(% masse de l'organe mixte)</b>                 | (10%)                                                                                                | (40%)                                                                                                   |                                                                                                                                         | (40%)                                                                                                                      |
| <b>Spécificité d'hôte</b>                          | aucune                                                                                               | Nulle à forte selon le couple                                                                           | ?                                                                                                                                       | ?                                                                                                                          |
| <b>Ancienneté</b>                                  | Silurien                                                                                             | Crétacé (ou plus tardif ?)                                                                              | Crétacé (ou plus tardif ?)                                                                                                              | Crétacé (ou plus tardif ?)                                                                                                 |
| <b>Ressources exploitées par le<br/>mycobionte</b> | Phosphore inorganique :<br>soluble ou adsorbé ;<br>oligoéléments                                     | Phosphore et azote organiques<br>ou minéraux : solubles,<br>adsorbés ou insolubles,<br>oligoéléments    | Mal connues et variables<br>Le mycobionte peut être<br>parasite ou mutualiste d'un<br>autre végétal (Monotropoïdes)                     | Phosphore et azote organiques,<br>parfois glucides insolubles<br>(cellulose...)                                            |
| <b>Localisation majeure</b>                        | Tous les sols, sauf<br>hydromorphes : sols<br>tropicaux et tempérés ; peu<br>fréquents en sol boréal | Divers sols, dont ceux<br>moyennement minéralisés :<br>sols tempérés et boréaux,<br>parfois tropicaux   |                                                                                                                                         | Sols à matière organique non<br>minéralisée : sols boréaux et<br>d'altitude surtout, les orchidées<br>sont plus ubiquistes |

Il existe différents types d'associations mycorhiziennes, répartis de façon différente notamment en fonction de la latitude. Si les mycorhizes primitives furent des endomycorhizes à vésicules et arbuscules parfaitement adaptées aux climats chauds et aux écosystèmes terrestres à minéralisation rapide qui existaient jusqu'à la fin de l'ère secondaire, la baisse des températures qui suivit détermina alors dès le tertiaire (LePage *et al.* 1997) l'apparition d'un autre type d'association, primordiale aujourd'hui pour la forêt tempérée : l'association ectomycorhizienne (Smith & Read, 1997).

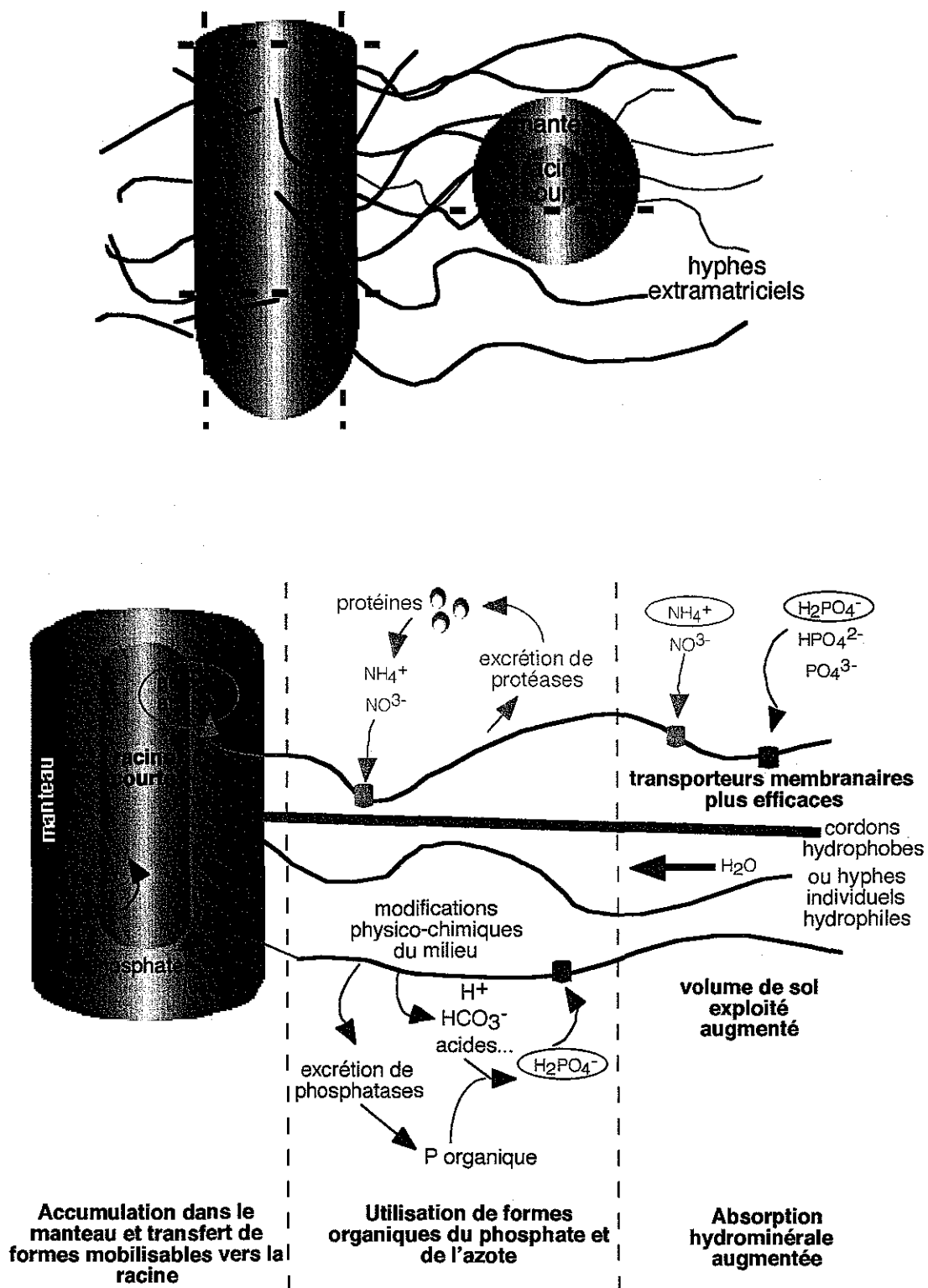
Les différents types décrits, le sont sur une base morphologique (Tableau 01). Ils impliquent des groupes de champignons et de plantes différents (Harley & Smith, 1983). Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VAM), premières apparues au cours de l'évolution, sont les plus répandues au niveau des plantes herbacées et ligneuses. Elles se développent sur sols minéraux, et concernent 200 à 500 espèces fongiques. Les autres types décrits sont les endomycorhizes éricoïdes à pelotons qui prédominent sous hautes latitude et altitude, dans des sols à humus de type mor (Smith & Read, 1997), les ectendomycorhizes, qui ne concernent qu'une faible quantité de champignons et restent mal connues, et enfin, les ectomycorhizes. Les ectomycorhizes impliquent plus de 5000 espèces fongiques Basidiomycètes ou Ascomycètes (Molina *et al.*, 1992) avec une spécificité d'hôte - généralement ligneux, gymnosperme ou angiosperme - qui varie énormément selon les cas. Cette symbiose ectomycorhizienne est pour sa part dominante dans les écosystèmes forestiers sous latitude et altitude intermédiaires possédant une litière développée.

*L'ectomycorhize : une structure et des fonctions caractéristiques de la forêt tempérée.*

Trois éléments caractérisent morphologiquement et anatomiquement la structure ectomycorhizienne (Fig. 01) : (i) le manteau fongique de structure variable qui enveloppe la racine de la plante ; (ii) des hyphes extra-matriciels qui partent du manteau pour explorer et exploiter le sol jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres de la racine ; et enfin (iii) le réseau de Hartig qui est constitué par des filaments mycéliens qui s'immiscent entre les cellules corticales de la racine sans pénétration intracellulaire (Smith & Read, 1997) comme cela est le cas pour les endomycorhizes. La majorité des espèces ligneuses forestières sociales de la région tempérée (notamment les Fagacées et les Pinacées) est concernée par la symbiose ectomycorhizienne. S'il existe parmi la très large gamme d'associations ectomycorhiziennes possibles (plus de 5000



**Fig. 01** : Vue éclatée d'une ectomycorhize. (D'après Lagrange, 1998).



**Fig. 02 :** Représentation schématique du rôle joué par l'ectomycorhize dans la nutrition hydrominérale.

espèces fongiques), une assez forte unité anatomique, en revanche, la diversité fonctionnelle est grande.

Les rôles généraux des deux partenaires peuvent cependant être énoncés : le champignon symbiotique reçoit de l'arbre le carbone nécessaire à son métabolisme sous forme de glucides issus de la photosynthèse végétale : le pourcentage de sucres produits par la plante et 'utilisés' par le champignon pourrait atteindre 30 à 40% (Söderström, 1992) (ces chiffres sont toutefois certainement surestimés car le flux de carbone n'est pas destiné en totalité au partenaire fongique puisque une partie est respirée par la racine elle-même). Le végétal, récupère une partie du carbone investi dans la symbiose, notamment par le biais de transfert d'acides aminés du partenaire fongique vers sa racine hôte (Genetet *et al.*, 1984). De son côté, le champignon procure de nombreux avantages au végétal. Il améliore en particulier la nutrition hydrominérale (Fig. 02) : cette amélioration concerne l'eau, les ressources minérales solubles du sol, phosphatées ou azotées, ainsi que les oligo-éléments (Mousain, 1989 ; Martin & Lorillou, 1997). La première explication à cette amélioration se trouve dans le fait que les hyphes extramatriciels du partenaire fongique, d'un diamètre inférieur à celui des racines courtes, explorent d'une manière plus efficace un volume de sol plus important (Garbaye & Guehl, 1997). Au niveau hydrique, la contribution du partenaire fongique est grande (Morte *et al.*, 2001) et le statut hydrique de l'arbre est profondément modifié par les apports du champignon (voir section ci-après). Concernant la nutrition minérale, le champignon associé permet l'exploitation de ressources organiques du sol, autrement inaccessibles à la plante ; notamment par le biais de sécrétions de protéases (Näsholm *et al.*, 1998) ou de phosphatases (Mousain, 1989), et dans certains cas, grâce à l'excrétion de protons ou d'agents chélatants qui permettent l'altération d'édifices cristallins (Jongmans *et al.*, 1997). Ces capacités expliquent probablement la réussite des ectomycorhizes dans les sols tempérés et boréaux, où les faibles températures n'autorisent ni une altération rapide de la roche mère, ni une minéralisation efficace de la matière organique. Un autre apport de la part du champignon, consiste en une protection phytosanitaire apportée au végétal : cela est réalisé par le biais d'une protection physique de la part du manteau, par un effet de compétition trophique, ou encore via la production de composés antibiotiques (phytoalexines, protéines PR) qui modifie la composition de la microflore locale (Frey *et al.*, 1997). Un dernier effet connu de la part du champignon est la modification du statut hormonal de l'hôte végétal. En effet, la synthèse de phytohormones par des champignons ectomycorhiziens a été rapportée par plusieurs auteurs : l'auxine lors de très nombreuses études (cf. Ditengou, 2000), mais aussi des gibbérellines et de

cytokinines chez *Boletus edulis* (Gogala, 1967 in Ditengou, 2000). L'AIA fongique est même une des molécules clef du processus symbiotique mycorhizien puisqu'elle induit une stimulation de la ramification et de la formation des racines latérales aboutissant à la structure caractéristique des systèmes racinaires mycorhizés (Slankis, 1973).

A un niveau intégré, la grande diversité fonctionnelle des associations ectomycorhiziennes est garante d'un effet ectomycorhizien global complémentaire voire synergique (Cairney, 1999). C'est cette complémentarité fonctionnelle de différents symbiotes qui pourrait procurer aux arbres une grande souplesse et une flexibilité d'adaptation face aux fluctuations des conditions environnementales. Au niveau d'un écosystème forestier cette diversité fonctionnelle du cortège ectomycorhizien évolue dans le temps et dans l'espace (Dahlberg, 2001).

### **Le statut hydrique des végétaux ectomycorhizés.**

*Le statut hydrique des végétaux est largement modifié par l'ectomycorhization*

Par rapport au nombre d'études conduites, axées sur le statut hydrique des végétaux endomycorhizés, très peu d'études ont été menées sur l'effet des champignons ectomycorhiziens. Les travaux de Morte *et al.* (2001) mettent cependant en évidence des effets sur l'hôte, relativement similaires à ceux produits par les endomycorhiziens (voir Augé, 2001). Par exemple pendant un stress (absence d'irrigation durant quatre mois), les baisses du potentiel hydrique foliaire et de la conductance stomatique enregistrées chez des plants de *Pinus halepensis* sont moins importantes lorsque ceux-ci sont colonisés par le champignon ectomycorhizien *Suillus mediteraneensis* (0,4 MPa de différence), suggérant une amélioration sensible du prélèvement d'eau pendant la période de stress due à la mycorhization. Pendant le stress, la croissance des plants ectomycorhizés n'est pas améliorée (des facteurs indépendants du statut hydrique interviennent certainement), mais après ré-irrigation, ces derniers ont une augmentation de biomasse supérieure, due à une amélioration du statut hydrique de *P. halepensis*. Guehl et Garbaye (1990) puis Dosskey *et al.* (1991), ont montré que si la transpiration était augmentée par l'ectomycorhization, l'efficacité d'utilisation de l'eau, c'est à dire le rapport de Carbone fixé dans la biomasse (activité photosynthétique nette) à la quantité d'eau transpirée (déterminée par la conductance stomatique des feuilles), était également améliorée. Des résultats similaires ont été obtenus par Nardini *et al.* (2000), qui ont montré que la colonisation des racines de *Quercus ilex* par *Tuber melanosporum* augmentait la conductance stomatique mais aussi l'activité photosynthétique nette des chênes, et par Parke *et al.*, (1983) qui ont trouvé, en conditions de

stress hydrique, un taux de photosynthèse nette supérieur chez des *Pseudotsuga mensiezii* ectomycorhizés par rapport aux mêmes plants non mycorhizés.

#### *La modification du statut hydrique du végétal par le champignon ectomycorhizien a plusieurs causes*

Les quatre points présentant les causes possibles des effets de l'endomycorhization sur le statut hydrique des végétaux colonisés (voir Morte *et al.*, 2000) semblent pouvoir être repris pour les champignons ectomycorhiziens :

1) L'aspect nutritionnel, et notamment la disponibilité augmentée en phosphore (Coleman, 1990), peut jouer un rôle clef dans la modification du statut hydrique des végétaux hôtes et l'amélioration des relations hydriques de ces hôte, surtout en cas de stress hydrique. Les effets positifs de l'ectomycorhization sur la nutrition peuvent avoir un effet direct ou indirect en permettant même en cas de stress un métabolisme actif, et en autorisant l'accumulation de composés protecteurs.

2) L'amélioration directe de l'absorption d'eau est chez les ectomycorhize très importante. Tout d'abord le volume de sol exploré est largement augmenté par l'existence de plusieurs centaines d'hyphes émanant du manteau ectomycorhizien et s'étendant jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres de celui-ci (Bowen, 1973). En plus, le très faible diamètre d'un hyphe extramatriciel (environ 2 à 5  $\mu\text{m}$ ) qui contraste avec celui d'une racine (100 à 500  $\mu\text{m}$ ), permet l'exploitation des micro-sites du sol. Lorsque l'eau devient rare, cette capacité d'accès à la porosité fine devient fondamentale.

La conduction de l'eau au niveau des hyphes extramatriciels s'effectue de manière passive selon le gradient de potentiel entre le sol et le végétal. Agerer (1991) puis Unestam et Sun (1995) ont proposé une typologie morphologique et fonctionnelle du mycélium extramatriciel. Au sein de cette typologie deux types peuvent être distingués. Le premier type correspond à la présence d'hyphes extramatriciels individuels ou peu agrégés, dont la surface est hydrophile. L'eau peut alors être absorbée sur toute la longueur de l'hyphe. La conduction se fait ainsi par un film capillaire, le long de la surface des hyphes (Garbaye *et al.*, 1993). Cette conduction est efficace lorsque le sol est relativement humide et que le film capillaire est continu le long de l'hyphe. Le second type correspond à des hyphes extramatriciels agrégés sous forme de cordons hydrophobes sauf à leurs extrémités où se fait l'absorption. Ces cordons plus ou moins structurés

(les plus structurés sont appelés rhizomorphes) se ramifient dans les zones du sol plus riches en eau. Les hyphes centraux sont parfois dépourvus de contenu cytoplasmique, tandis que leur *septa* peuvent disparaître, leur donnant une structure de vaisseau conducteur. La conduction est cette fois-ci interne au cordon et plus efficace que dans le type précédent, en particulier en condition de contrainte hydrique.

Si la surface d'absorption est augmentée, la conductivité hydraulique d'un système racinaire ectomycorhizé n'est cependant pas toujours améliorée comme cela semble être le cas pour les systèmes endomycorhizés (Ruiz-Lozano et Azcon, 1995). Par exemple, la conductivité hydraulique par unité de surface se trouve réduite d'un facteur de 0,44 chez des chênes (*Quercus ilex*) associés à *Tuber melanosporum* (Nardini *et al.*, 2000). Mais il doit exister de fortes variations selon le type d'association qui sont fonction notamment du rapport partie aérienne / partie souterraine (Anderson *et al.*, 1988) et de la morphologie du mycélium externe (Garbaye et Guehl, 1997) puisque la conductivité hydraulique de racines de *Ulmus americana* est améliorée par *Hebeloma cylindrosporum* (Muhsin et Zwiazek, 2002).

Signalons enfin que l'amélioration directe de l'absorption d'eau peut également provenir, d'une éventuelle régulation par le partenaire fongique, des transports d'eau par les aquaporines (*water channel transport*). Cette hypothèse est cependant discutée (voir Muhsin et Zwiazek, 2002).

3) L'intervention d'hormones fongiques au sein du partenaire végétal est avérée (Karabaghli *et al.*, 1997). Si l'action d'ABA produite par le champignon sur la régulation stomatique n'est aujourd'hui que suggérée, Morte *et al.* (2001) précise que la symbiose mycorhizienne modifie la sensibilité stomatique à l'ABA et/ou les quantités d'ABA transférés vers les feuilles.

4) La régulation osmotique (combinée ou non à la 'régulation élastique') peut être un moyen efficace de modifier le statut hydrique du végétal hôte et de limiter les effets du stress hydrique (perte de turgescence notamment). Dans l'étude de Morte *et al.* (2001) alors que le potentiel hydrique foliaire de *Pinus halepensis* ectomycorhizés par *Suillus mediteraneensis* est maintenu élevé en conditions de stress hydrique (plus de 0,4 MPa de différence avec les plants non mycorhizés), le potentiel osmotique, lui, reste identique à celui des plants non mycorhizés, et il n'y a pas de phénomènes de régulation osmotique au niveau des cellules foliaires. Par contre, Wartinger *et al.* (1994), ont montré qu'il y avait une régulation osmotique provoquée chez *Pseudotsuga mensiezii* par la mycorhization par *Laccaria laccata*. Cette régulation osmotique

**Tableau 02.** Principales méthodes moléculaires utilisées en écologie (D'après Selosse, 1998).

| Méthode                        | RFLP                                                                                           | PCR dirigée                                                                                                                                                                                                                                                        | PCR/RLP (et SSCP)                                                                                                            | AFLP                                                                                                                          | AFLP                                                                                                    |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Principe</b>                | Hybridation d'une sonde ADN sur de l'ADN digéré et séparé sur gel                              | Amplification exponentielle d'un locus délimité par deux amorces flanquantes                                                                                                                                                                                       | PCR, suivie d'une digestion par des endonucléases (ou d'une migration en conditions dénaturantes pour la SSCP)               | Digestion de l'ADN, <i>ligation</i> de fragments-amorces à certains fragments digérés, puis PCR                               | PCR sur des loci aléatoirement amplifiés par fixation d'une amorce unique en conditions peu stringentes |
| <b>Amplification du signal</b> | Sonde radioactive (ou parfois fluorescente)                                                    | Amplification <i>in vitro</i> par une enzyme thermostable ( <i>Taq</i> polymérase), grâce à la répétition d'un cycle thermique permettant successivement : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces initiant la réplication et enfin la polymérisation. |                                                                                                                              |                                                                                                                               |                                                                                                         |
| <b>Base de la spécificité</b>  | Choix de la sonde                                                                              | Choix des amorces et donc du locus, souvent unique. Les conditions thermiques sont déterminantes                                                                                                                                                                   |                                                                                                                              | Lors de la <i>ligation</i> , choix de certains fragments digérés                                                              | Amorces et conditions de température choisies                                                           |
| <b>Source de variabilité</b>   | Polymorphisme au niveau des sites de restriction et/ou insertions/délétions dans les fragments | Variation en taille du locus choisi                                                                                                                                                                                                                                | Polymorphisme au niveau des sites de restriction et/ou insertions/délétions dans les fragments correspondant au locus choisi | Présence vs absence (marqueurs dominants) ou polymorphisme de taille (marqueurs co-dominants) de certains fragments amplifiés |                                                                                                         |
| <b>Avantages</b>               | Spécifique et reproductible                                                                    | Très spécifique (donc applicable même quand plusieurs génomes sont présents, par ex. deux symbiotes) et sensible (réclame peu d'ADN).                                                                                                                              |                                                                                                                              | Amplifie plusieurs loci simultanément. Génère fréquemment de nombreux polymorphismes.                                         |                                                                                                         |
| <b>Inconvénients</b>           | Manipulation de la radioactivité                                                               | Exige de connaître les séquences des sites d'hybridation des amorces                                                                                                                                                                                               | Coût des enzymes.                                                                                                            | Amplification de l'ADN contaminant                                                                                            | Parfois peu reproductible                                                                               |

concerne les cellules racinaires et les cellules foliaires mais n'a pas été enregistrée de manière simultanée dans les deux parties du végétal (au niveau des racines lors d'un premier stress hydrique et au niveau des feuilles lors d'un second stress consécutif). Cette régulation osmotique peut émaner d'une amélioration de la nutrition minérale par le champignon mais peut-être aussi d'une synthèse de composés osmorégulateurs et/ou osmoprotecteurs (Wartinger *et al.*, 1994).

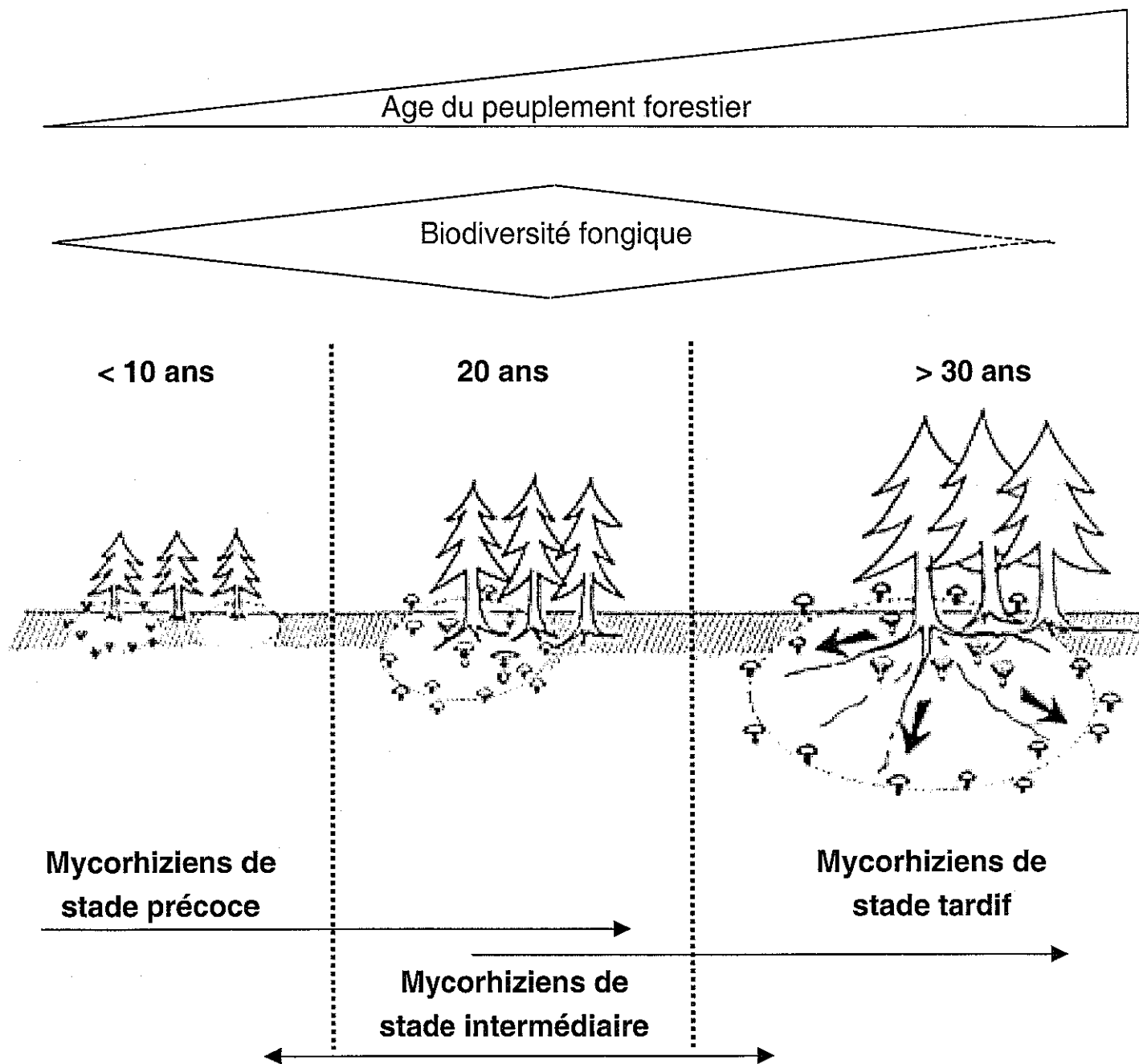
### **Les mycorhizologues ont décrit et expliqué la structure et la dynamique des populations de quelques champignons ectomycorhiziens.**

*Il est possible de décrire la structure et la dynamique des populations d'ectomycorhiziens.*

Grâce essentiellement à l'avènement des méthodes de biologie moléculaire (Gardes *et al.*, 1991 ; Horton & Bruns, 2001), la diversité des champignons ectomycorhiziens a pu être décrite: (i) au sein d'une communauté, les différentes espèces peuvent être identifiées (Dahlberg, 2001) ; (ii) au niveau intra-spécifique, les différents génotypes d'une population peuvent être révélés (Debaud *et al.*, 1995). Ces techniques sont plus ou moins discriminantes et connaissent des applications diverses (Tableau 02). En particulier, les techniques les plus puissantes ne peuvent pas toujours être utilisées directement sur les ectomycorhizes. Les études d'écologie moléculaire, si elles visent à appréhender la biodiversité des communautés ou à une échelle plus réduite des populations, se sont souvent attachées à décrire la structure et la dynamique des populations.

*A l'échelle d'un écosystème, il existe une dynamique temporelle et spatiale des populations de champignons ectomycorhiziens.*

Frankland (1998) a défini le phénomène des successions des champignons ectomycorhiziens au cours du temps comme des changements dirigés, dans la composition, l'abondance relative et la distribution spatiale des espèces constituant une communauté. Les successions se traduisent par des phénomènes de colonisation et de disparition d'espèces différentes qui aboutissent théoriquement *in fine* à un stade d'équilibre stable ou climax. Les premières études ont toutes été basées sur le suivi au cours du temps, de l'apparition-disparition des carpophores des espèces qui fructifient. Il est ainsi apparu qu'il existe au cours de la succession une gradation dans l'apparition-disparition des champignons ectomycorhiziens. Plusieurs études, comme celle de Dahlberg et Stenlid (1995), se sont attachées à décrire la dynamique des populations fongiques en



**Fig. 03 :** Successions fongiques en fonction du vieillissement du peuplement forestier. Le diagramme est basé sur l'apparition des carpophores et définit des espèces de stades précoces et tardifs (d'après Last *et al.*, 1987).

fonction du vieillissement du peuplement forestier. En règle générale, la diversité fongique augmente au cours du temps lors des stades précoces, via le recrutement de nouvelles espèces, puis, la diversité des carpophores diminue (Selosse, 1998a, b). Initialement, le phénomène de succession a été décrit en opposant les espèces de champignons pionniers colonisant le sol et les racines-hôtes par le biais de spores souvent abondantes et appelés *early stage fungi* (espèces de stade juvénile) aux espèces dominantes dans les forêts plus âgées, se développant essentiellement par croissance végétative, et définies comme des *late stage fungi* (espèces de stade tardif) (Fig. 03). Cela se traduit par un paradigme décrivant deux comportements extrêmes : (i) pour une espèce fongique de stade précoce se développant essentiellement par dispersion de spores, les génets\* sont petits et nombreux et ils autorisent la reproduction sexuée en produisant de nombreux carpophores, (ii) au contraire, pour une espèce de stade tardif se développant majoritairement par croissance végétative, les génets\* sont généralement grands et peu nombreux. Plusieurs études ont montré l'adéquation de ce schéma avec l'autécologie de différentes espèces : (i) grands génets associés à un développement végétatif majoritaire pour *Suillus bovinus* (Dahlberg and Stenlid., 1994), *Suillus pungens* (Bonello *et al.*, 1998), *Suillus variegatus* (Dahlberg, 1997) ou bien (ii) génets restreints et prééminence de la reproduction sexuée pour *Pisolithus tinctorius* (Anderson *et al.*, 1998), *Hebeloma cylindrosporum*, (Gryta *et al.*, 1997), *Laccaria bicolor* (Selosse *et al.* 1998a, b) ou *Laccaria amethystina* (Gherbi *et al.*, 1999 ; Fiore-Donno & Martin, 2001).

Mais ce concept dichotome a laissé place à un schéma tenant compte de l'aspect plus continu des colonisations par les champignons ectomycorhiziens. Aussi, le terme de *multistage fungi* faisant référence à des champignons pionniers en termes de colonisation mais qui se maintiennent également dans les forêts adultes a fait son apparition. Dahlberg et Stenlid (1994) ont observé les populations de *Suillus bovinus* dans des forêts d'âges différents ce qui leur a permis de montrer que *S. bovinus* était présent à plusieurs stades de maturité de la forêt mais qu'avec l'âge de la forêt, la taille des génets grandissait tandis que leur nombre diminuait. Zhou *et al.* (2001) avancent toutefois, dans le cas de *Suillus grevillei*, que c'est l'emplacement du genet qui est modifié au cours du temps plus que la taille du genet elle-même. Pour *S. bovinus*, Dahlberg et Stenlid (1995) suggèrent qu'après une colonisation initiale réalisée grâce à des basidiospores, ferait suite une croissance végétative avec élimination compétitive de certains génets. Dès que la population a terminé son recrutement, les spores méiotiques n'auraient plus

\* genet est synonyme de clone et correspond à un complexe d'ectomycorhizes, de mycélium extra radiculaire et de carpophores d'un seul et même génotype, qui se développe à partir d'un mycélium souterrain

sur place un rôle de colonisation (Selosse *et al.*, 1998 ; Gryta *et al.*, 2000). Plusieurs travaux ont ensuite également souligné les limites du schéma dichotome, en montrant par exemple que le développement *via* la production de spores n'était pas réservé à des stades précoces et que chez certaines espèces fongiques, les spores méiotiques peuvent jouer un rôle important même en conditions stables. Dans ce cas, la compétition liée à la croissance végétative ne serait pas suffisante pour interdire le recrutement de nouveaux génotypes. C'est le cas en particulier pour *Laccaria amethystina* dans une hêtraie d'altitude de 140 ans (Gherbi *et al.*, 1999). Citons également les travaux de Fiore-Donno & Martin (2001) qui ont souligné la prédominance de la sporulation chez ce même *Laccaria amethystina* dans une forêt mixte âgée, ou Redecker *et al.* (2001) qui ont obtenu les mêmes types de résultat chez plusieurs Russulacées se développant dans les pinèdes de la Sierra Nevada. En plus des limites précédemment discutées de ce modèle dichotome, la plupart des études parce qu'elles étaient réalisées à partir de récoltes de carpophores ne prenaient en compte qu'une image partielle des populations de champignons ectomycorhiziens. En effet, même si dans certains cas, il existe une bonne corrélation entre la structure génétique et spatiale des ectomycorhizes et des carpophores (ex cas d'*Hebeloma cylindrosporum* dans la pinède landaise, Guidot *et al.*, 2001), cela ne semble pas concerner l'ensemble des espèces ectomycorhiziennes. La fructification est un phénomène complexe qui varie d'une espèce à l'autre (Gardes et Bruns, 1996 ; Dahlberg *et al.*, 1997 ; Gehring *et al.*, 1998 ; Jonsson *et al.*, 1999a) : certaines espèces qui forment peu de mycorhizes fructifient abondamment, alors que d'autres formant de nombreuses ectomycorhizes fructifient peu. D'autre part, la communauté de carpophores semblerait beaucoup plus affectée par les facteurs environnementaux et les modifications de l'écosystème que la communauté ectomycorhizienne (Jonsson *et al.*, 1999a ; Jonsson *et al.*, 2000, Peter *et al.*, 2001). Peter *et al.* (2001) ont montré par exemple, qu'un amendement en azote inorganique ne modifie que très peu, à court terme, la diversité des champignons ectomycorhiziens au niveau souterrain alors que la diversité des carpophores est par contre très affectée. Cela pourrait résulter d'une diminution des apports de photosynthétats destinées à la fructification due au coût élevé de l'assimilation de l'azote supplémentaire (Lilleskov et Bruns, 2001). Pour leur part, Jonsson *et al.* (1999b) suggèrent qu'au niveau de la communauté des ectomycorhizes, contrairement à celle des carpophores, il existe une réelle continuité dans la composition du cortège ectomycorhizien entre des racines de jeunes plants et celles d'arbres âgés.

Même si une certaine continuité existe, à un instant donné, le cortège ectomycorhizien possède des caractéristiques adaptées au type de sélection imposé par le milieu. Ces caractéristiques répondent à des stratégies écologiques. A partir du modèle de croissance des populations de Verhulst, MacArthur (1967) a distingué, chez les animaux, deux types de stratégie : la stratégie *r* (taux de multiplication sexuée élevé et cycle court, surtout efficace à faible densité et en milieu instable) et la stratégie *k* (croissance et durée de vie longue, optimisant la survie de la descendance, surtout efficace à forte densité et en milieu stable). D'autres auteurs ont précisé ces approches : Grime (1977) a défini trois stratégies chez les végétaux supérieurs. Cette approche a été adaptée aux champignons par Pugh (1980), puis plus précisément aux ectomycorhiziens par Last *et al.* (1987). On distingue donc : (i) la stratégie compétitive (C) qui optimise la compétitivité ou encore la "combativité" : elle est favorisée en milieu riche et stable, via la croissance végétative ; (ii) la stratégie de tolérance au stress (S) qui réduit les vigueurs végétative et reproductive, mais développe des adaptations aux milieux hostiles. Et enfin, (iii) la stratégie rudérale (R) à forte vigueur reproductive et à cycle court qui est adaptée aux milieux perturbés mais riches. Ce type de description autorise une vision plus continue des phénomènes de colonisations-compétitions qui régissent la dynamique des populations de champignons ectomycorhiziens. Si ce concept de stratégies n'est pas opposé à celui décrivant les phénomènes de successions, son intérêt réside dans le fait qu'il peut s'appliquer aux modèles soulignant l'aspect 'historique' dans lequel la dynamique des populations soumises constamment à des accidents ('*accidents of history*' in Dahlberg, 2001) n'aboutit jamais à des stades d'équilibre et livre une dynamique davantage affranchie de l'aspect temporel.

#### *Une image actuelle de la communauté des champignons ectomycorhiziens*

Horton et Bruns (2001), après revue des travaux consacrés aux populations des champignons ectomycorhiziens, déduisent que ces communautés sont très diverses même lorsque quelques espèces dominent largement. Au sein de cette communauté, de nombreux morphotypes sont rares et les ectomycorhizes ont tendance à être disposées sous forme d'agrégats.

## Etablir le lien entre diversité fonctionnelle et génétique constitue le défi principal de l'écologie des champignons ectomycorhiziens.

### *Etat de l'art...et perspectives*

Il ne fait désormais aucun doute que l'ectomycorhize est un acteur majeur de l'écosystème forestier (Buscot *et al.*, 2000) et de ce constat découle la nécessité d'en apprendre davantage sur l'identité et la structure des populations des organismes responsables de ces processus clef (Read, 2000). D'une part, la physiologie et le fonctionnement général de l'ectomycorhize sont aujourd'hui bien décrits, d'autre part, la connaissance des structures et des dynamiques de population sont connus pour de nombreux champignons ectomycorhiziens. Il apparaît clairement que ces deux volets : étude génétique des populations et étude fonctionnelle, sont étroitement liés. La fluctuation des populations dépend essentiellement de la '*Fitness*' qui est régie en grande partie par des facteurs physiologiques. D'un autre côté, à un niveau intégré, l'aspect fonctionnel au niveau d'un écosystème forestier va dépendre de la structure d'une population et des interactions des populations au sein de la communauté ectomycorhizienne. Etablir le lien entre ces deux types de connaissances est dès lors un objectif prioritaire.

### *Quelle est la difficulté constituée par l'établissement de ce lien ?*

Tout d'abord, établir un lien entre l'étude des populations de champignons ectomycorhiziens et la fonction de ces mêmes populations sous-entend qu'on étudie précisément l'entité fonctionnelle elle-même, qui est l'ectomycorhize *in situ*. Or, cette dynamique fonctionnelle des ectomycorrhizes constitue encore un aspect mal connu et les guildes fonctionnelles (ou groupes fonctionnels *in* Loreau *et al.*, 2001) d'ectomycorrhizes constituent une véritable 'boîte noire' (Horton et Bruns, 2001). A l'heure actuelle, les études reliant la structure génétique et des données fonctionnelles concernant les champignons ectomycorhiziens ont été réalisées à partir de mycelia issus de carpophores. Comme par exemple, le travail très complet de Colpaert *et al.* (2000) qui établit un lien entre la tolérance aux métaux lourds et la structure génétique de populations de *Suillus luteus*. Ces auteurs ont montré l'incidence de la pression de sélection imposée par la présence, dans le sol, de métaux lourds sur la structure des populations de ce Basidiomycète étudiée à partir de récoltes de carpophores. Concernant les ectomycorrhizes, si de nombreux outils permettant la discrimination de la diversité génétique sont désormais disponibles et aujourd'hui utilisés, les données physiologiques font davantage défaut. D'une part, leur acquisition *in situ* s'avère délicate (contrairement aux tests *in vitro* réalisés sur des isolats

mycéliens) et les résultats obtenus en conditions contrôlées sont loin de pouvoir décrire le fonctionnement des ectomycorhizes dans des écosystèmes complexes (Buscot *et al.*, 2000). D'autre part, ces études physiologiques ne révèlent bien souvent qu'un nombre très restreint de caractères physiologiques, qui ne suffisent pas à appréhender l'aspect fonctionnel global de l'ectomycorhize. La réponse sera vraisemblablement donnée par l'utilisation d'outils moléculaires : le développement de l'ingénierie génomique et l'obtention de profils d'expression génique à l'aide de réseaux d'ADNc (*microarrays*), devraient permettre à terme : (i) de décrire la composition des communautés et populations fongiques du sol (métagénomique) et (ii) d'avoir une idée précise des fonctions physiologiques développées à un instant donné au sein d'une ectomycorhize (Martin, 2001). Pour l'heure, il est essentiel de corrélérer la diversité génétique observée avec l'état de marqueurs physiologiques ciblés sur des fonctions précises.

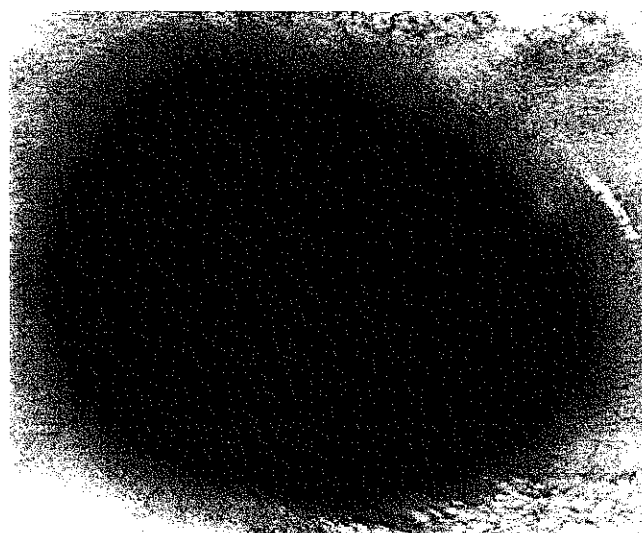
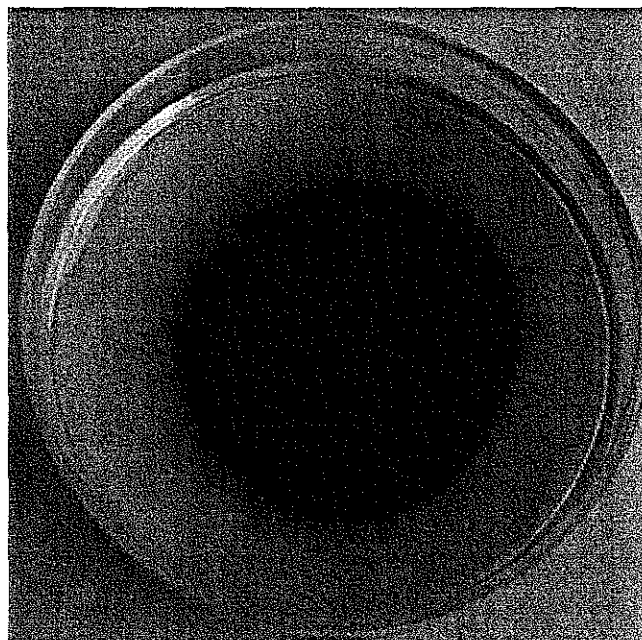
### *Les applications en foresterie*

Connaître la variabilité fonctionnelle inter- mais aussi intra-spécifique des champignons ectomycorhiziens permet de sélectionner au mieux les souches destinées à la mycorhization contrôlée des plantations (Mousain *et al.*, 1994). La disponibilité en eau étant le premier facteur de l'environnement qui limite la production forestière, il semble important de connaître les espèces, et d'une manière plus précise, les génotypes, qui favorisent le plus l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers. Ceci permettrait de pratiquer des inoculations contrôlées ou de conduire au mieux la sylviculture d'un peuplement afin de favoriser les souches fongiques intéressantes. A ce titre, le champignon ectomycorhizien *Cenococcum geophilum* apparaît comme étant un bon candidat quant à un rôle potentiel dans l'optimisation de l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers.

### ***Cenococcum geophilum***

#### *Présentation*

*Cenococcum geophilum* Fr. est un des champignons ectomycorhiziens les plus fréquemment décrits sous forme d'ectomycorhizes ou de sclérotés. Il s'agit d'un Ascomycète ne possédant pas de stade sexué connu qui forme des ectomycorhizes au sein d'une large gamme d'habitats en s'associant à de nombreux hôtes. *C. geophilum* est donc un champignon ectomycorhizien cosmopolite et à faible spécificité d'hôte.



**Fig. 04** : Photographies de mycelia de *C. geophilum* cultivés sur un milieu MEA2% (extrait de malt agar 2%) surmonté d'une feuille de cellophane.

### *C. geophilum*, trois entités

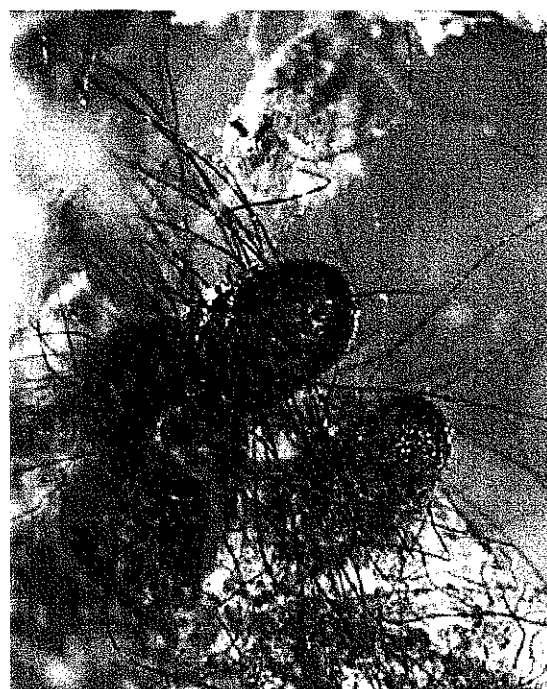
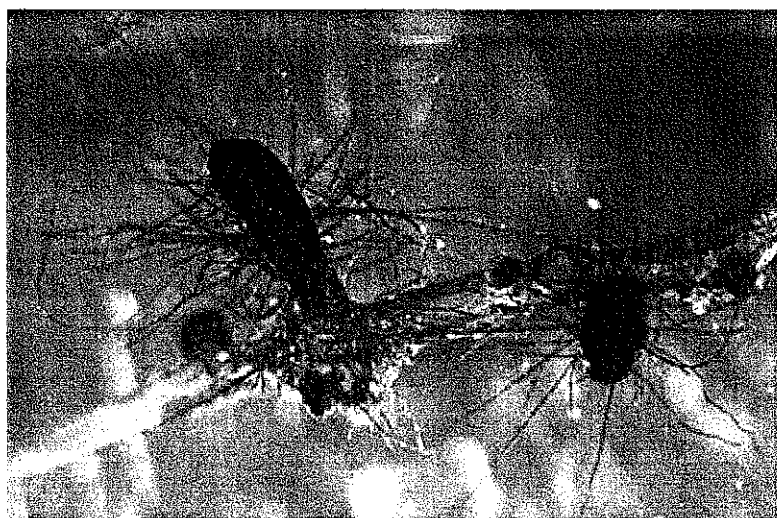
Champignon asexué, *C. geophilum*, ne produit pas de carpophores. Par contre, on trouve fréquemment sur les systèmes racinaires ses ectomycorhizes, et dans le sol, des sclérotes qu'il forme en abondance. Le mycélium végétatif de *C. geophilum* peut facilement se cultiver sur milieu gélosé *in vitro*.

### Le mycélium végétatif

D'après les observations de Trappe (1962), reprises par Lo Buglio (1998) une description morphologique et anatomique caractéristique du mycélium végétatif de *C. geophilum* peut être dressée. *C. geophilum* développe en culture *in vitro* un mycélium (Fig. 04) marron foncé à noir (les zones plus jeunes peuvent arborer une teinte plus claire), à l'aspect duveteux. La coloration noire est due à la présence de mélanines au niveau des parois cellulaires. Les hyphes ont un aspect rigide, et ne sont qu'occasionnellement ramifiés. S'ils s'agrègent parfois, ils ne sont jamais rhizomorphiques. Les septa sont simples et les parois cellulaires épaisses (de 0,2  $\mu\text{m}$  à 0,7  $\mu\text{m}$  pour les hyphes plus âgées). La croissance de ce mycélium est lente ; un optimum de 1,2 mm par jour à 25°C a été mesuré par Neves Machado (1995). Des variations au niveau de la morphologie, de la vitesse de croissance, de la température ou du pH optimum ont été observées d'un isolat à l'autre (Cline *et al.*, 1987 ; LoBuglio *et al.*, 1991).

### Les ectomycorhizes

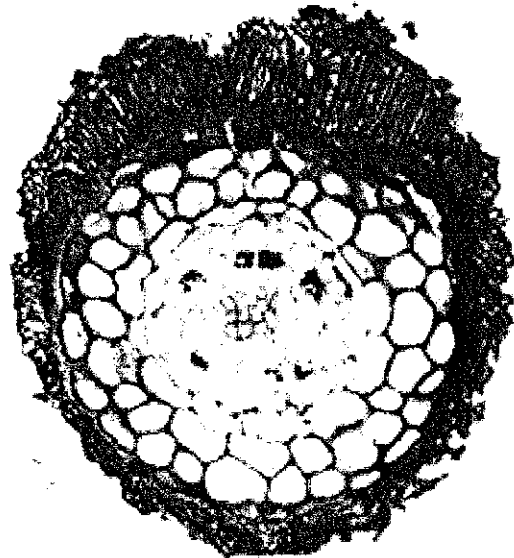
Les ectomycorhizes de *C. geophilum* (Fig. 05) sont d'un noir charbon plus foncé que celui du mycélium en culture pure. Elles sont de petite taille et généralement non ramifiées. Le degré de mélanisation varie, mais l'absence de mélanine n'existerait que dans les parties ayant pénétré le végétal (Ponge, 1990 ; Paris *et al.*, 1993). Depuis la surface du manteau à l'aspect granuleux (Ingleby *et al.*, 1990) s'initient des hyphes raides, non ramifiés, souvent incurvés (Agerer, 1995), formant un mycélium extramatriciel généralement bien développé. Les parois cellulaires de ces hyphes sont épaisses, ce qui explique leur aspect rigide, et leur diamètre important (Pigott, 1982a). Le manteau habituellement peu épais de 20 à 40  $\mu\text{m}$ , est composé d'hyphes très sombres, de gros diamètre pour les plus externes, de plus petit diamètre pour celles plus proches de la racine hôte. La structure cellulaire de ce manteau (Fig. 06) est compacte et il possède les caractéristiques d'un synenchyme (Pigott, 1982a). Les parois (particulièrement celles des cellules des hyphes les plus externes) sont très épaisses et contiennent de la mélanine associée à des



**Fig. 05 :** Photographies d'ectomycorhizes impliquant *C. geophilum* et des racines courtes de hêtre.



B



**Fig. 06 :** Coupes longitudinales et transversales d'ectomycorhizes de *C. geophilum* montrant le manteau et le réseau de Hartig. (d'après LoBuglio). (A) coupe longitudinale x2000 du manteau d'une ectomycorhize de *C. geophilum* montrant le motif céphalothécoïde émanant d'une croissance radiale des hyphes du manteau ; (B) coupe transversale x130 d'une ectomycorhize, le développement du manteau n'est pas uniforme.



**Fig. 07 :** Photographie d'un sclérote de *C. geophilum*.

protéines et à des chitines (Mangin *et al.*, 1986) comme cela est le cas dans les cuticules d'arthropodes. Ce caractère pourrait leur conférer une certaine résistance à la dégradation. Les hyphes externes sont recouverts par un matériel dense et épais qui semble isoler l'ectomycorhize du sol. Ce mucilage résulterait d'exsudations pariétales et pourrait constituer une protection (Genet, 1999). A la surface du manteau, se forment des amas caractéristiques de cellules isodiamétriques, entourées par des gaines d'autres cellules allongées. Cette structure crée une forme étoilée parfois appelée profil céphalothécoïde (Trappe, 1971). Le réseau de Hartig, continu et unisériel, présente des hyphes de petit diamètre qui s'étendent sur un nombre d'assises corticales qui varie selon l'hôte (Trappe, 1971).

### *Les sclérotés*

*C. geophilum* comme d'autres champignons ectomycorhiziens tels que *Pisolithus tinctorius* (Greenville *et al.*, 1985), *Paxillus involutus* (Greenville *et al.*, 1985) ou encore *Hebeloma sacchariolens* (Fox, 1986), peut former des sclérotés (Fig. 07). Dans le cas de *C. geophilum*, cette production est très abondante. Dahlberg *et al.* (1997) ont noté dans une pessière suédoise, une très forte biomasse de sclérotés de *C. geophilum*: ils ont relevé 440 Kg (production annuelle moyenne) de biomasse fongique sous forme de sclérotés de *C. geophilum*, contre 250 à 400 Kg sous forme de mycorhizes toutes espèces confondues. Ces propagules pourraient servir de formes de résistance durant les périodes de stress environnementaux, et constituer ainsi un avantage compétitif dans ces conditions. Les sclérotés peuvent être dispersés par différents vecteurs, tels que l'eau, les insectes, les oiseaux et les rongeurs. Les sclérotés vivants, d'un diamètre pouvant atteindre plus d'1 mm, sont fermes et contiennent en grand nombre des réserves lipidiques solubles dans l'éthanol (Massicotte *et al.*, 1991). L'initiation du sclérote implique des modifications d'ordre morphologique, ainsi que des changements dans l'orientation de la croissance (Massicotte *et al.*, 1991). Des sections de sclérotés matures révèlent une structure bien différenciée en medulla-cortex montrant une organisation pseudo-parenchymateuse, avec un cortex mélanisé de structure compacte.

### ***C. geophilum*, un ectomycorhizien cosmopolite.**

#### *C. geophilum* possède un large spectre d'hôtes.

*C. geophilum* est certainement le champignon ectomycorhizien qui possède la plus faible spécificité d'hôte. Il forme en effet des ectomycorhizes avec un large spectre d'hôtes. Au total, ses hôtes connus représentent 200 espèces d'arbres appartenant à 40 genres différents, gymnospermes ou angiospermes. Des ptéridophytes comme *Dryopteris filixmas* (Molina & Trappe, 1982) sont également colonisés par *C. geophilum*, mais aussi des herbacées comme la plante alpine *Kobresia myosuroides* (Lipson *et al.*, 1998).

#### *C. geophilum*, des habitats très divers

Trappe (1962) a largement contribué à la description de la répartition géographique de *C. geophilum*. Il a échantillonné des ectomycorhizes de *C. geophilum* aussi bien dans l'hémisphère nord que dans l'hémisphère sud et cela dans des environnements très variés. En effet, Les ectomycorhizes de *C. geophilum* ont été observées près du cercle polaire arctique en Alaska ou au Canada (Trappe, 1962), sous des climats subtropicaux en Floride ou tropicaux à Porto-Rico (Trappe, 1962) ou encore dans des milieux alpins où les conditions peuvent s'avérer extrêmes et où peu d'ectomycorhiziens sont présents (Read et Haselwandter, 1981 ; Vogt *et al.*, 1982 ; Trappe, 1988). Dans les forêts tempérées et boréales, les ectomycorhizes de *C. geophilum* sont souvent dominantes : 47% des ectomycorhizes dans une hêtraie de plaine française (Blaise and Garbaye, 1983) ou encore 18% d'abondance relative dans une pessière suédoise (Dahlberg *et al.*, 1997).

C'est dans les conditions difficiles, que *C. geophilum* serait le plus compétitif. En milieu alpin, Trappe (1988) a révélé qu'à 2700 m, l'abondance relative de *C. geophilum* était de 90% alors que celle-ci était diminuée de moitié 100 m plus bas où les conditions étaient moins extrêmes. La production abondante par *C. geophilum* de sclérotés très résistants pourrait assurer la présence d'un inoculum important même en conditions difficiles, et expliquer le caractère pionnier de *C. geophilum* dans de telles conditions. Trappe (1962) rapporte par exemple que *C. geophilum* a été le premier à mycorhizer de manière prédominante les systèmes racinaires de jeunes plants de *Pinus albicaulis* et de *Larix lyalli* colonisant des moraines dans les glaciers de la chaîne des Cascades de l'Oregon. Une autre explication de la réussite de *C. geophilum* en milieu difficile est donnée par Ponge (1990) qui souligne la capacité de *C. geophilum* à exploiter des sources de matières organiques comme des aiguilles de pin ou même des cadavres d'arthropodes,

ce qui pourrait lui donner un avantage certain dans des milieux faiblement minéralisés. Vogt *et al.*, (1982) ont ainsi observé la prédominance de *C. geophilum* dans des sols faiblement décomposés avec une forte accumulation de matière organique.

### ***C. geophilum* : relations trophiques**

#### ***Nutrition et métabolisme du phosphore chez C. geophilum***

Mejstrik et Krause (1973) ont montré que l'absorption du phosphore organique était augmentée chez des plants de *Pinus radiata* lorsqu'ils étaient mycorhizés par *C. geophilum*. *A contrario*, ces auteurs ont observé une réduction de l'absorption pour le phosphore inorganique. Antibus *et al.* (1992) ont par ailleurs vérifié que lors de sa croissance sur milieu contenant du phosphore organique, *C. geophilum* absorbait davantage de phosphore que les basidiomycètes testés par ailleurs. De plus, une corrélation a été établie entre le nombre d'ectomycorhizes de *C. geophilum*, l'influx de phosphore et la masse sèche des plants d'*E. globulus* (Heinrich et Patrick *in* LoBuglio, 1998). Cette capacité à utiliser le phosphore organique est certainement due, comme chez beaucoup d'ectomycorhiziens, à la sécrétion de phosphatases acides. Antibus *et al.* (1981, 1986) ont précisé la présence d'une phosphomonoestérase à la surface de racines ectomycorhizées par *C. geophilum*. Bae et Barton (1989) ont pour leur part isolé une phosphatase alcaline à partir de cultures de *C. geophilum*.

Dans le mycélium, le phosphate est stocké sous forme de polyphosphates (Martin *et al.*, 1983), vraisemblablement associés à des cations et à des molécules telles que des acides aminés, des polypeptides ou des polyamines (Martin *et al.*, 1985).

#### ***Nutrition et métabolisme azotés chez C. geophilum***

*C. geophilum* possède une croissance plus rapide à de faibles concentrations en azote apporté sous forme de  $\text{NH}_4^+$  (Littke *et al.*, 1984). Par ailleurs, Abuzinadah et Read (1986) ont montré que *C. geophilum* utilisait avec plus d'efficacité des sources organiques protéiques comme la serum-albumine bovine ou la gliadine que le  $\text{NH}_4^+$ . Ces mêmes auteurs ont suggéré l'existence d'une protéase acide à large spectre produite par *C. geophilum*. *C. geophilum* a aussi la possibilité d'utiliser des acides nucléiques. Concernant l'assimilation de l'azote, plusieurs travaux ont décrit les processus d'assimilation du  $\text{NH}_4^+$  dans les ectomycorhizes de *C. geophilum*. Cette assimilation se ferait grâce à l'activité conjuguée et séquentielle de la GDH à NADP et de la GS (Genetet *et al.*, 1984 ; Martin, 1985 ; Martin *et al.*, 1988). Une fois *C. geophilum* associé à son hôte, la GDH

fongique apparaît réprimée (Martin, 1986). L'azote assimilé semble majoritairement se retrouver sous forme de glutamine qui sert de précurseur à la synthèse d'arginine accumulée en grande quantité (Martin, 1985 ; Martin *et al.*, 1988). La glutamine représenterait une forme de séquestration rapide et constituerait la source d'azote endogène, alors que l'arginine, forme plus stable, aurait davantage une fonction de réserve à long terme (Martin, 1985).

#### *Nutrition et métabolisme carbonés chez C. geophilum*

Il a été observé que *C. geophilum* pouvait croître à partir de sources carbonées très diverses pour un champignon ectomycorhizien (Palmer et Hacskeylo, 1970). Concernant les réserves carbonées accumulées par *C. geophilum*, Koide *et al.* (2000) ont montré que le mannitol représenterait 75% des sucres présents chez *C. geophilum*. Martin *et al.* (1984) ont montré que les formes principales de réserve du carbone étaient constituées par le mannitol et par des triglycérides. Le rapport entre triglycérides et mannitol évoluant avec l'âge du champignon. Au niveau du métabolisme primaire carboné, Martin (1985) a souligné deux particularités chez *C. geophilum* : (i) l'importance du cycle du mannitol comme voie d'assimilation du glucose et mécanisme producteur de NADPH ; et, (ii) l'importance des voies anaplérotiques fixant le CO<sub>2</sub>\* qui permettent entre autres d'alimenter le cycle des acides tricarboxyliques en squelettes carbonés lorsque la demande en  $\alpha$ -cétoglutarate est forte (synthèse importante d'acides aminés...).

#### ***Cenococcum geophilum* : résistance au stress hydrique**

##### *C. geophilum* est résistant à la sécheresse.

Plusieurs auteurs ont signalé la résistance de *C. geophilum* à la sécheresse édaphique. Neves Machado (1995) a révélé, en conditions contrôlées, la tolérance élevée des ectomycorhizes de *C. geophilum* associées à *Eucalyptus globulus* dans des conditions de faibles potentiels hydriques du sol. Pigott (1982a,b) a observé *in situ* sur des racines de *Tilia cordata*, que contrairement aux autres ectomycorhizes, les ectomycorhizes de *C. geophilum* demeuraient vivantes même après une chute du potentiel hydrique à -5,5 MPa. *C. geophilum* protégerait les racines contre la dessiccation et leur permettrait de rester vivantes et fonctionnelles jusqu'aux prochaines pluies, améliorant ainsi indirectement l'efficacité des racines superficielles en permettant une reprise rapide de l'absorption d'eau et d'éléments minéraux. A côté de ces observations sur les ectomycorhizes *in situ*, plusieurs études ont permis de décrire le comportement de *C. geophilum* en culture pure, soumis *in vitro* à des conditions de stress hydrique induit selon diverses

\* carboxylations par les enzymes phosphoenolpyruvate carboxykinase et pyruvate carboxylase

méthodes. Mexal et Reid (1972) ont utilisé des solutions de polyéthylène glycol (PEG) afin d'induire un stress hydrique pour tester un isolat de *C. geophilum*. Celui-ci s'est avéré résister aux plus faibles potentiels induits et sa croissance optimale était obtenue pour -1,5 Mpa. Neves Machado (1995) a suivi le comportement de 22 isolats de différents champignons ectomycorhiziens cultivés sur des milieux contenant des solutions de PEG (donnant des potentiels hydriques de -0,2 MPa jusqu'à -0,9 MPa) ou implantés en conditions d'atmosphère desséchante grâce à l'utilisation de solution salines saturées (51% ou 31% d'humidité relative). Ce sont deux isolats de *C. geophilum* qui ont présenté la meilleure survie en atmosphère desséchante et dont la croissance n'était pas affectée au potentiel de -1,5 Mpa, le plus faible utilisé dans cette étude. Cependant elle a aussi révélé une certaine hétérogénéité dans la résistance au stress hydrique selon l'isolat de *C. geophilum* testé. Ce dernier constat émanait également des travaux de Coleman et al., (1989) qui ont testé 55 isolats appartenant à 18 espèces d'ectomycorhiziens placés en culture dans des conditions de stress hydrique croissant (-0,2 à -3 MPa). Trois classes de réponse au stress ont été décrites correspondant à trois classes de champignons plus ou moins résistants au stress hydrique induit. *C. geophilum* était la seule espèce dont les différents isolats se répartissent dans les trois classes suggérant de la part de ce champignon une grande variabilité intra-spécifique dans sa réponse au stress hydrique.

#### *Résistance à d'autres stress*

Peu d'études ont été menées concernant la résistance à des stress autres que la sécheresse. LoBuglio (1998) cite seulement Vogt et al. (1981) qui suggère que la compétitivité de *C. geophilum* en milieu sub-alpin pourrait être dû à sa capacité de résistance aux faibles températures.

#### *Quel peut être le déterminisme de la résistance au stress hydrique de C. geophilum et de ses ectomycorhizes ?*

Aucune étude n'a encore apporté une réponse concernant le déterminisme de la grande résistance à la sécheresse de *C. geophilum* et des ectomycorhizes qu'il forme avec ses hôtes végétaux, les protégeant ainsi de la sécheresse. Certaines hypothèses peuvent cependant être évoquées.

En premier lieu, cette résistance pourrait être due à la structure particulière des ectomycorhizes formées par *C. geophilum*. Notons en particulier que les parois épaisses des hyphes du manteau contiennent des mélanines associées à des protéines au sein de leur paroi. La

mélanisation des parois n'est pas un phénomène courant chez les champignons ectomycorhiziens (Vralstad *et al.* 2001), mais les mélanines fongiques peuvent être essentielles pour la protection des champignons contre les stress environnementaux (Bell et Wheeler, 1986 ; Butler *et al.*, 2001). Dans leur revue sur les mélanines fongiques, Butler et Day (1998) rapportent que les mélanines ont été parfois décrites comme anti-dessiccants. La structure et la géométrie des hyphes simples de *C. geophilum* n'apparaissent pas pour Pigott (1982b) particulièrement efficaces dans l'exploitation en eau du sol par rapport à d'autres ectomycorhizes formant des cordons hydrophobes. En revanche, la structure synenchymateuse du manteau avec ses parois cellulaires épaisses et entourées d'une gaine mucilagineuse pour les hyphes du manteau superficiel rappelle celle des champignons impliqués dans la formation des lichens. La paroi de ces champignons, à la manière d'une éponge, retient l'eau pendant les périodes sèches, formant ainsi une réserve momentanée. Ce serait également le cas pour *C. geophilum*. Cependant, cette même étude montre que pour les ectomycorhizes de *C. geophilum* cette 'réserve' ne pourrait entretenir la transpiration de l'arbre que pendant un maximum d'une heure ; cela n'explique donc pas l'intégrité des racines qui est préservée sur de longues périodes en conditions de stress hydrique.

En second lieu, on pourrait imaginer une protection liée à l'accumulation intra-cellulaire de composés solubles ayant un rôle osmoprotecteur ou osmorégulateur. Le potentiel hydrique des hyphes d'un champignon se développant dans le sol s'équilibre avec le potentiel environnant ; il comprend deux composantes : le potentiel osmotique, fonction de la concentration en solutés, et le potentiel de turgescence qui s'équilibre avec le potentiel osmotique et répond à la déformation des parois cellulaires. Les perturbations de la croissance des champignons à bas potentiels hydrique sont principalement dues à la perte de turgescence des cellules (Ray *et al.*, 1972). La présence de composés solubles osmotiquement actifs, donc à rôle osmorégulateur, peut permettre de contrôler cette perte de turgescence. De plus, le déficit hydrique entraîne la dénaturation des protéines qui forment alors des liaisons intra- et inter-moléculaires au niveau de leurs groupes polaires au lieu de former des liaisons hydrogène avec H<sub>2</sub>O. La dénaturation des enzymes conduit à l'altération du métabolisme cellulaire. Un composé soluble à rôle osmoprotecteur peut dans certains cas se 'substituer à l'eau' en stabilisant les protéines et en empêchant leur dénaturation, préservant ainsi le métabolisme cellulaire (Brown, 1990). Les composés osmorégulateurs ou osmoprotecteurs connus chez les champignons peuvent être des sels minéraux (K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>), des acides aminés (glutamate,  $\gamma$ -aminobutyrate, proline), des glucides (tréhalose, mannitol, glycérol). *C. geophilum* renferme de grandes quantités de mannitol (Martin *et al.*, 1984) qui pourrait ainsi

jouer un rôle de protection contre le stress hydrique. Il pourrait aussi y avoir intervention d'autres composés en cas de stress.

### ***Cenococcum geophilum* : pas de sexe, mais une grande diversité génétique.**

#### *Premier ectomycorhizien Loculoascomycète*

Une analyse portant sur la partie de l'ADNr codant l'ARN 18S a montré que *C. geophilum* serait le premier champignon ectomycorhizien de la classe des Loculoascomycetes (LoBuglio *et al.* 1996).

#### *Des caractéristiques cytogénétiques mal connues*

Peu de données sont disponibles concernant les caractéristiques cytogénétiques de *C. geophilum*. Par exemple, aucune étude n'a précisé sa ploïdie. Les ascomycètes étant normalement septés (ce ne sont pas des champignons coenocytiques vrais) et possédant des noyaux haploïdes, le nombre de noyaux déterminerait la ploïdie ; haploïdie si *C. geophilum* est monocaryotique et diploïdie si *C. geophilum* est dicaryotique. Stülten *et al.* (1995) décrivent l'isolation et la régénération de protoplastes dérivant de mycélium de *C. geophilum* de deux souches différentes. L'une de ces deux souches (SIV) a donné de bons résultats et une observation des noyaux après marquage des acides désoxyribonucléiques par l'acridine orange a permis aux auteurs de distinguer la présence d'un seul noyau dans la majorité des protoplastes. Ce résultat laisse donc présager un état monocaryotique haploïde pour *C. geophilum*. Toutefois, la souche SIV ne possède pas, d'après notre expérience (Cf. Chapitre I), une région ITS de l'ADN ribosomique nucléaire caractéristique de *C. geophilum*. Les résultats de Stülten n'apporteraient donc pas d'information sur *C. geophilum*.

#### *Une diversité génétique étonnante...*

Plusieurs travaux ont fait état de la diversité génétique importante de *C. geophilum*. LoBuglio *et al.* (1991) ont étudié par RFLP de l'ADNr nucléaire la diversité de *C. geophilum*. Sur 71 isolats d'origines géographiques diverses, 32 génotypes différents ont pu être distingués, les homologues de séquences variant de 44% à 100%. Cette hétérogénéité importante non corrélée aux autres paramètres analysés (origine, morphologie des mycelia en culture ou encore nature de l'hôte végétal) suggéraient que l'espèce morphologique *C. geophilum* était génétiquement très hétérogène ou constituait un complexe d'espèces. Une étude PCR-RFLP restreinte à la région de

l'ITS de l'ADNr nucléaire, habituellement très conservée au niveau des espèces, a permis de distinguer parmi ces 71 isolats, 20 ribotypes différents (Shinohara, 1994). De la même façon Farmer & Sylvia (1998), ont distingué 4 types d'ITS différents parmi 19 isolats de *C. geophilum*. Il est rare de trouver autant de types d'ITS au sein d'une même espèce. Une analyse de la séquence ITS d'un représentant de chacun des 20 types différents obtenus par Shinohara (1994) a cependant indiqué qu'il existait au niveau de cette région 96% d'homologie. Les différences entre séquences de l'ADNr nucléaire proviennent essentiellement de divergences au niveau de l'IGS, ou au niveau de l'intron du groupe I CgSSU (Rogers *et al.*, 1993 ; Shinohara *et al.*, 1996). *C. geophilum* est donc un groupe taxonomique cohérent, voire vraisemblablement une espèce unique.

#### *... pour un champignon asexué*

S'il n'est pas étonnant de rencontrer une grande diversité génétique chez une espèce fongique possédant un habitat et une gamme d'hôtes aussi variés que *C. geophilum*, on peut davantage s'étonner de trouver autant de diversité chez un organisme dépourvu de reproduction sexuée, et donc du brassage méiotique qui en résulte. Plusieurs hypothèses ont été avancées : (i) il existe une forme sexuée cryptique non encore identifiée ; (ii) il peut s'agir d'une lignée récemment dérivée d'une espèce sexuée, ou (iii) *C. geophilum* est une espèce issue d'une vieille lignée asexuée apparue avec les Loculoascomycètes lorsque cette classe a divergé des autres lignées d'Ascomycètes filamenteux. Cette troisième hypothèse est tout à fait plausible, dans le sens où l'absence de sexualité n'interdit pas toute recombinaison (Taylor *et al.*, 1999). En effet, des phénomènes de parasexualité peuvent produire de la recombinaison créant ainsi une très grande hétérogénéité génétique (Anderson et Kohn, 1998 ; Taylor *et al.*, 1999). De plus, *C. geophilum* n'est pas la seule espèce présentant cette particularité : les Glomales qui ont peu changé morphologiquement depuis 300 millions d'années n'ont pas de sexualité connue. Pourtant, les populations de ces champignons présentent une variabilité génétique importante (Sanders, 1999).

#### *La structuration des populations de C. geophilum est méconnue*

Plusieurs travaux (LoBuglio *et al.*, 1991 ; 1996 ; Shinohara *et al.*, 1994 ; 1996 ; 1999) ont donc analysé la diversité de *C. geophilum*, mais n'ont par contre pas fourni de données concernant la structuration spatiale ou la dynamique des populations de ce champignon ectomycorhizien. Taylor et Bruns (1999) ont toutefois noté lors d'une étude de la structure de communautés

fongiques une distribution spatiale de *C. geophilum* très localisée et dense. Cette distribution pourrait être expliquée par la production localisée des sclérotés et l'absence de spores. D'autre part, Visser (1995) caractérisait *C. geophilum* comme un '*multi-stage fungus*' puisqu'il était représenté quantitativement d'une manière assez homogène au sein de pinèdes de différents âges (6, 41, 65 ou 122 ans).

#### *La biodiversité fonctionnelle de C. geophilum*

A ce jour, aucune corrélation n'a été établie entre la diversité génétique intraspécifique de *C. geophilum* et d'autres facteurs : origine, morphologie ou physiologie. Genet (1999) a mis en évidence un lien entre le type de sol colonisé et la morphologie de mycorhizes de *C. geophilum*, mais sans caractériser *C. geophilum* d'un point de vue génétique. Il est donc indispensable d'identifier d'éventuelles corrélations entre caractéristiques écophysiologiques et diversité génétique de *C. geophilum*. La mise en évidence d'un lien entre résistance à la sécheresse édaphique et profil génétique permettrait de développer une stratégie de sélection raisonnée autorisant une optimisation du cortège ectomycorhizien en conditions de stress hydrique.

### **La hêtraie lorraine**

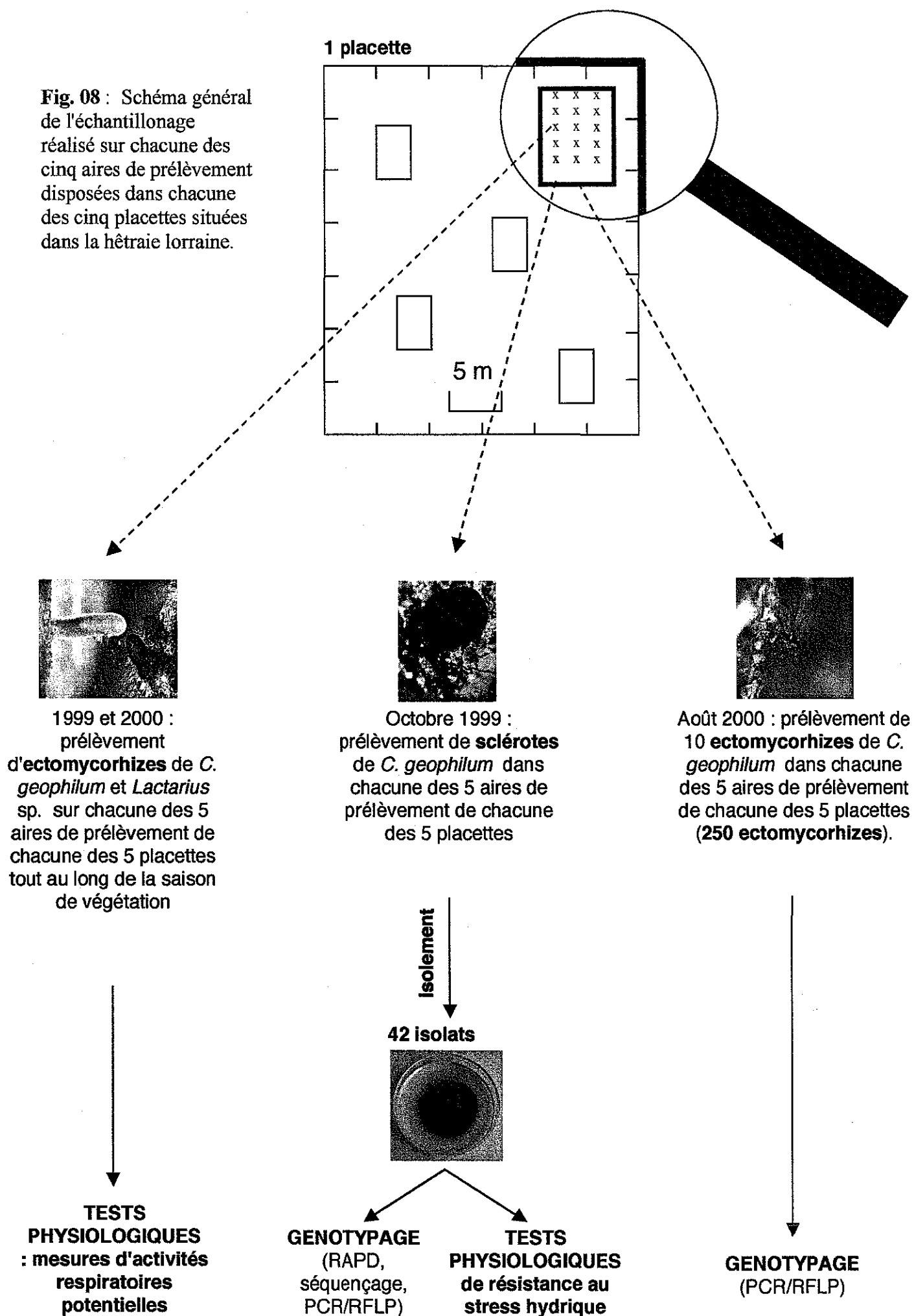
#### *Le hêtre dans la Région Lorraine*

Le hêtre (*Fagus silvatica* L.), Angiosperme de la famille des Fagacées, occupe plus du quart (26 %) de la surface forestière des quatre départements de la Région Lorraine et contribue pour 50 % à la production de bois d'œuvre feuillu de la Région. En France, la Région Lorraine produit à elle seule 24 % du bois d'œuvre de hêtre (statistiques du Ministère de l'Agriculture, 1992). Le hêtre occupe pratiquement tous les types de sol à l'exception des plus hydromorphes et constitue le trait dominant des paysages forestiers lorrains. Indépendamment de la sylviculture actuelle, le hêtre est partout indigène en Lorraine et est une composante importante des associations climaciques locales : la plupart des hêtraies lorraines sont donc qualifiées de "naturelles", et la régénération naturelle y est la règle dominante de sylviculture.

#### *Le cortège ectomycorhizien de la hêtraie Lorraine*

Les racines courtes du hêtre dans le nord-est de la France sont pratiquement colonisées à 100%. Voiry (1981) a distingué 43 types morphologiques d'ectomycorhizes différents contre 15 seulement en chênaie. Parmi ces 43 types, 5 seulement sont présents dans plus d'une station :

**Fig. 08 :** Schéma général de l'échantillonnage réalisé sur chacune des cinq aires de prélèvement disposées dans chacune des cinq placettes situées dans la hêtraie lorraine.



*Hebeloma crustuliniforme*, *Lactarius blennius*, *Lactarius subdulcis*, *Tuber albidum* et *C. geophilum*. C'est *C. geophilum*, qui présente la plus grande amplitude écologique puisqu'il est présent dans tous les types de station : mull calcique, mull eutrophe, mull mésotrophe, moder et mor. *C. geophilum* apparaît donc quantitativement comme une espèce importante dans le cortège ectomycorhizien de la hêtraie lorraine.

#### *La hêtraie Lorraine et C. geophilum*

*C. geophilum* apparaît pouvoir jouer un rôle clef dans l'intégrité fonctionnelle des racines et dans l'alimentation hydrique des hêtraies lorraines. C'est cette hypothèse, que nous nous sommes proposés d'explorer. Nous avons ainsi sélectionné cinq sites représentatifs de la diversité de la hêtraie lorraine. Ces cinq sites sont en effet très contrastés tant au point de vue édaphique que climatique, et sont disséminés le long d'un transect, au sein d'une surface avoisinant 400 Km<sup>2</sup>. La caractérisation génétique et fonctionnelle des populations de *C. geophilum* prélevé sous forme d'ectomycorhizes ou de sclérotas a été menée sur ces cinq sites (Fig. 08).

#### **Les objectifs de l'étude**

Les objectifs de notre études étaient:

- 1- Préciser dans un *Premier Volet (Chapitres I et II)*, la structuration des populations de *C. geophilum* en mettant en évidence les facteurs stationnels et génétiques déterminants.
- 2- Evaluer dans le cadre d'un *Second Volet (Chapitres III et IV)* la contribution de *C. geophilum* au statut fonctionnel des racines en accordant une importance particulière au stress hydrique.

En visant ces deux objectifs, nous souhaitons :

- 3- Etablir un lien au sein d'un *Troisième Volet (Chapitre V)*, entre la structure génétique et physiologique de *C. geophilum* afin de mieux appréhender la dynamique fonctionnelle de ce champignon ectomycorhizien et ainsi apporter quelques éléments propres à optimiser l'efficacité du cortège mycorhizien pour permettre aux peuplements de mieux faire face à des épisodes de sécheresse.

***Premier Volet : Caractérisation génétique des  
populations de *Cenococcum geophilum* au sein  
de la hêtraie Lorraine***

# Chapitre I

---

**Amplification PCR spécifique de l'ITS de *Cenococcum geophilum*, détection d'un champignon affine aux genres *Hymenoscyphus* et *Phialophora* associé aux ectomycorhizes de *C. geophilum***

---

## Introduction

La plupart des études des populations de champignons ectomycorhiziens ont ciblé les carpophores, dont l'échantillonnage, l'identification et le traitement sont relativement aisés. Pour certaines espèces, et dans certaines conditions, l'étude des carpophores semble appropriée (ex : *Hebeloma cylindrosporum*, Guidot *et al.*, 2001), cependant il est des cas où la concordance entre la structure génétique et spatiale entre mycorhizes et carpophores est mauvaise (Gardes et Bruns, 1996 ; Dahlberg *et al.*, 1997 ; Gehring *et al.*, 1998 ; Jonsson *et al.*, 1999a). Dans d'autres cas, certains champignons ne fructifient pas, rendant l'utilisation des mycorhizes obligatoire. Or l'utilisation en écologie moléculaire des ectomycorhizes peut s'avérer fastidieuse. En effet, (i) celles-ci sont plus difficiles à récolter et à identifier que les carpophores, (ii) la quantité de matériel (ADN) disponible est réduite par rapport à un carpophore, et (iii) la mycorhize associe deux génomes (plante hôte et champignon symbiotique) auxquels peuvent s'ajouter ceux d'autres champignons parasites (Genet, 1999) ou symbiotiques (Jumpponen *et al.*, 1998). Les deux derniers points peuvent être résolus en isolant du mycélium à partir des ectomycorhizes, mais cette étape introduit un biais, puisque certains génotypes peuvent être plus récalcitrants que d'autres à l'isolement. Il s'avère donc nécessaire de développer des outils optimisés pour de faibles quantités de matériel qui permettent l'identification rapide des ectomycorhizes en autorisant l'amplification spécifique de l'espèce ciblée.

*Cenococcum geophilum* Fr. est un champignon ectomycorhizien considéré comme asexué qui ne produit pas de carpophores. Son étude réclame donc l'utilisation des ectomycorhizes qu'il forme. Dans le cas de *C. geophilum*, la morphologie des ectomycorhizes a souvent été décrite comme très caractéristique, rendant son identification aisée (Dahlberg *et al.*, 1997). Pourtant, Vralstad *et al.* (2002) ont noté que des ectomycorhizes formées par *Hymenoscyphus ericae* ressemblaient à celles de *C. geophilum*, et Wilcox et Wang (1897a,b) ont conclu qu'un examen microscopique était nécessaire afin de distinguer les mycorhizes formées par *C. geophilum* de celles formées par *Phialophora finlandia* et *Chloridium paucisporum*. Ces dernières données montrent qu'il est souhaitable de disposer d'outils de détection de *C. geophilum* plus efficaces qu'une simple identification visuelle des ectomycorhizes sous loupe binoculaire. De plus, il apparaît que l'amplification par réaction de polymérisation en Chaîne (PCR) de l'ADN des ectomycorhizes noires du type *C. geophilum* connaît des taux de réussite relativement faibles par rapport aux autres morphotypes (Timonen *et al.*, 1997). Ces auteurs, qui ont réalisé des



amplifications de la région ITS (*internal transcribed spacer*) de l'ADN ribosomique nucléaire de plusieurs champignons ectomycorhiziens, évoquent la présence éventuelle dans les extraits d'ADN dérivant de mycorhizes noires (type *C. geophilum*) de pigments (mélanines notamment) ou d'autres métabolites secondaires se liant aux acides nucléiques et perturbant la réaction de PCR. Mais ils suggèrent surtout la possible présence d'ADN provenant d'autres champignons associés de manière plus ou moins intime à la mycorhize de *C. geophilum* et qui pourraient, par effet compétitif, réduire le rendement de l'amplification PCR.

Afin de pouvoir amplifier avec un bon rendement l'ITS de l'ADN ribosomique nucléaire de *C. geophilum* à partir des ectomycorhizes (en évitant la concurrence exercée par d'autres champignons), et simultanément, d'identifier spécifiquement *C. geophilum*, nous avons élaboré des amorces présumées spécifiques de *C. geophilum*. Par ailleurs, ces amorces nous ont permis de constater que l'isolement à partir d'ectomycorhizes de *C. geophilum* pouvait conduire à l'obtention d'une culture mycélienne d'un champignon au morphotype noir différent de *C. geophilum* que nous avons déterminé affine aux genres *Phialophora* et *Hymenoscyphus* et proche également d'une souche mycelienne (SIV) généralement considérée comme appartenant au genre *Cenococcum*. Les résultats de cette étude suggèrent une association plus ou moins intime d'un champignon tiers au sein des ectomycorhizes de *C. geophilum*.

## Matériels et Méthodes

### Détermination des amorces CGITS1 et CGITS2

Un alignement (programme MultAlin : <http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>) (Corpet, 1988) de 16 séquences de l'ITS de l'ADNr de *C. geophilum* disponibles dans la banque de données informatique GenBank (NCBI) (numéros d'accès : Z48521 et Z48523 à Z48537 ; ces isolats proviennent en majorité du continent américain et de suisse, Shinohara *et al.*, 1999) (Fig. I-1) a permis l'identification de deux séquences de 20 paires de bases (pb) communes à l'ensemble des séquences analysées. Ces deux amorces sont localisées respectivement à l'intérieur de l'ITS1 : CGITS1 (5'-TGACGATTGACTCATGTTGC-3') et à l'intérieur de l'ITS2 : CGITS2 (5'-TTCAAAGCGAAAGATTCTGC-3'). Nous avons par ailleurs vérifié l'absence de ces séquences au sein de l'ITS de l'ADNr d'une souche de *Phialophora finlandia* (disponible sous le numéro d'accès AF011327 dans GenBank, NCBI) et d'une souche d'*Hymenoscyphus ericae* (disponible sous le numéro d'accès AF069439 dans GenBank, NCBI) puisque les mycorhizes formées par ces deux espèces ont été décrites comme morphologiquement proches de celles formées par *C.*

*geophilum* (Wilcox et Wang, 1897a,b et Vralstad *et al.*, 2002 respectivement). Les deux amorces CGITS1 et CGITS2 ont été synthétisées et fournies par Invitrogen (Invitrogen, CA, USA) et ont permis l'amplification chez *C. geophilum* d'une portion de l'ITS de l'ADNr nucléaire que nous avons appelée *CGITS*.

#### *Prélèvement d'ectomycorhizes et de sclérotas*

Les ectomycorhizes et les sclérotas de *C. geophilum* ont été prélevés au sein de cinq hêtraies adultes de la région Lorraine, et identifiés sur la base des descriptions de Agerer (1995) et Ingleby *et al.* (1990). Les ectomycorhizes retenues étaient formées uniquement en association avec des racines de *Fagus silvatica* L.. Que ce soit pour les extractions d'ADN ou pour la mise en culture, le matériel a été conservé à 4°C pendant une durée toujours inférieure à 7 jours.

#### *Mises en culture et isolements*

Les sclérotas ou les ectomycorhizes ont subi une désinfection de surface par immersion pendant 30 min. dans une solution commerciale contenant de l'hypochlorite de sodium (Domestos, Lever-Fabergé, Zoug, Suisse) suivie de dix rinçages dans de l'eau stérile. Après désinfection, un sclérote ou une ectomycorhize est placé(e) dans une boîte contenant un milieu de Pachlewski solide (Pachlewski and Pachlewska, 1974). Les différents isolats obtenus ont été maintenus en culture à 25°C et repiqués tous les trois mois.

#### *Souches fongiques de référence*

Trois souches disponibles au laboratoire et répertoriées comme *C. geophilum* ont été utilisées afin de tester les amorces CGITS1 et CGITS2 : l'isolat 147-54 originaire de Suède (CentraalBureau voor Schimmelcultures, Pays-bas ; isolé à partir de racines de conifères par Lihnell, 1935), l'isolat A-145 originaire d'Oregon aux Etats-Unis (isolé à partir de mycorhizes de Douglas par Todd, 1974) et l'isolat SIV originaire du Nord-Est de la France (isolé à partir de mycorhizes d'Epicéa par Kiffer, 1974). Les isolats ont été maintenus en culture à 25°C à l'obscurité dans des boîtes contenant du milieu de Pachlewski solide (Pachlewski and Pachlewska, 1974) surmonté d'une feuille de cellophane.

### *Extraction de l'ADN et amplification PCR*

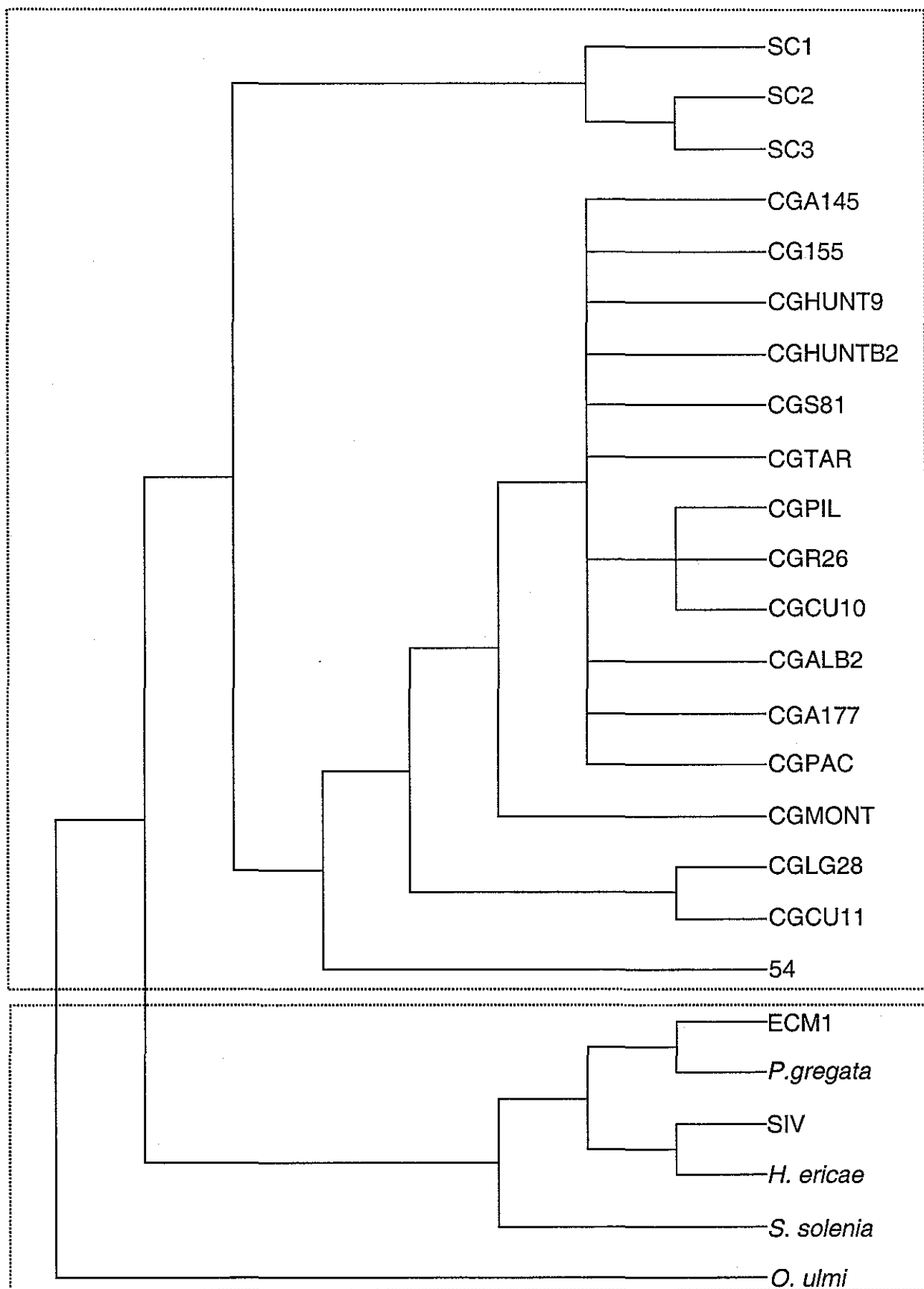
L'ADN total a été extrait directement d'ectomycorhizes (une seule racine courte ectomycorhizée et non ramifiée) ou de 10 mg de mycélium en culture pure en utilisant le kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) selon le protocole recommandé par le fabricant. Les amplifications PCR ont été réalisées dans les conditions suivantes : 5 µl de l'extrait d'ADN ont été ajoutés à un mélange réactionnel de 50 µl contenant 0.6 µM de chaque amorce (Invitrogen) (amorces ITS1 et ITS4 d'après White *et al.*, 1990 ; CGITS1 et CGITS2, voir ci-avant ; ou bien Kinha1 et Kinha2, voir ci-après), 200 µM dNTP (Qbiogene), 2.5 unités de REDTaq DNA polymerase (SIGMA, MO, USA) et 5 µl de la solution REDTaq PCR Reaction Buffer. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur Perkin Elmer GeneAmp 9600 (Perkin Elmer Instruments) dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 1 min, suivie de 30 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 0,5 min, une hybridation amorce/matrice à 50°C pendant 0,5 min et une polymérisation à 72°C pendant 2 min, suivis d'une polymérisation finale à 72°C pendant 10 min.

### *Séquençage*

Le séquençage de l'ITS de l'ADNr (à partir des amorces ITS1 et ITS4), ou de la région *CGITS* (chez *C. geophilum* uniquement, à partir des amorces CGITS1 et CGITS2) a été effectué en utilisant le kit BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) et un séquenceur automatisé ABI genotyper 310 (Applied Biosystems, CA, USA).

### *Réalisation du dendrogramme phylogénétique*

Plusieurs séquences ITS de l'ADNr nucléaire ont été alignées (programme MultAlin, Corpet, 1988). Ces séquences proviennent de : trois isolats dérivant de sclérotés de *C. geophilum*, un isolat dérivant d'une mycorhize de *C. geophilum*, l'isolat de *C. geophilum* 147-54 disponible dans la mycothèque du laboratoire, 15 isolats de *C. geophilum* disponibles dans GenBank (NCBI) (numéros d'accès : Z48521, Z48523 à Z48527 et Z48529 à Z48537), un isolat d'*Hymenoscyphus ericae* (numéro d'accès : AF069439 dans GenBank), un isolat de *Phialophora gregata* (numéro d'accès : U66731 dans GenBank), un isolat de *Solenopezia solenia* (numéro d'accès : U57991 dans GenBank) et un isolat d'*Ophiostoma ulmi* (numéro d'accès : AF198232 dans GenBank). L'alignement a été soumis à une analyse de parsimonie avec la méthode heuristique dans



**Fig. I-2 :** Dendrogramme résultant d'une analyse heuristique de parsimonie effectuée sur la base d'un alignement multiple des séquence ITS de différents isolats fongiques. Les isolats dont le code d'identification débute par CG sont des isolats de *C. geophilum* dont la séquence ITS est disponible dans GenBank (NCBI), SC1, SC2, SC3 dérivent de cultures de sclérotés de *C. geophilum* et ECM1 dérive d'une culture d'une ectomycorhize de *C. geophilum*.

PAUP4.08b (PPC / Altivec) (Swofford, 1999). Le dendrogramme consensus est présenté dans la Fig. I-2.

#### *Détermination des amorces Kinha1 et Kinha2*

Deux amorces ont été définies dans la séquence ITS de l'ADNr nucléaire d'un isolat obtenu après mise en culture d'une ectomycorhize de *C. geophilum*. Les séquences de 20 paires de bases de ces deux amorces : Kinha1 (5'-TCCCGAAACCCCGAAGCTGG-3') et Kinha2 (5'-CGCGATTCCCAAGACCAAGC-3') sont absentes de l'ITS de l'ADNr de 17 souches de *C. geophilum* analysées (numéros d'accès : Z11998, Z48521 et Z48523 à Z48537).

### **Résultats**

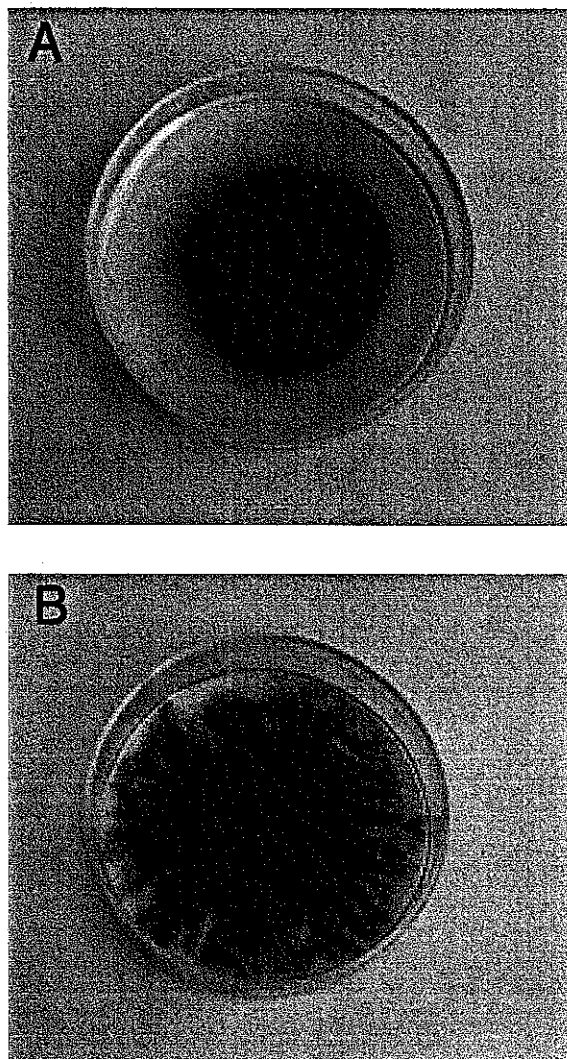
#### *Amplification de CGITS à partir de mycélia de référence et à partir d'ectomycorhizes de C. geophilum*

L'amplification avec les amorces universelles ITS1 et ITS4 à partir des trois extraits provenant des mycélia SIV, 147-54 et A145 livre un produit voisin de 525 pb. L'amplification avec les amorces CGITS1 et CGITS 2, donne un produit d'amplification approchant 320 pb avec les extraits des isolats 147-54 et A145, par contre, aucun produit n'est obtenu dans le cas d'extraits provenant de l'isolat SIV.

Par rapport à l'utilisation des amorces universelles ITS1 et ITS4, celle des amorces CGITS1 et CGITS2 double le taux de réussite des amplifications réalisées à partir d'extraits provenant d'ectomycorhizes (80% contre 40% de PCR produisant un signal). De plus, l'utilisation des amorces spécifiques CGITS1 et CGITS2 sur des extraits provenant d'ectomycorhizes, évite, comme cela est le cas avec ITS1 et ITS4, la production de deux signaux : un fragment d'ADN d'environ 525 pb correspondant à l'ITS de *C. geophilum* et un deuxième fragment d'environ 700 pb, qui pourrait résulter de l'amplification de l'ITS de la racine du hêtre ou bien de celui d'un autre champignon. Nous ne pouvons trancher faute d'avoir séquencé ce fragment.

#### *Amplification de CGITS à partir des isolats dérivant de la mise en culture de sclérotés ou d'ectomycorhizes de C. geophilum*

Les PCR effectuées grâce à l'utilisation du couple d'amorces CGITS1/CGITS2 ne permettent pas l'obtention d'un produit d'amplification lorsque les extraits proviennent d'isolats dérivant



**Fig. I-3** : Deux phénotypes de mycélium fongique après 9 semaines de culture sur milieu de Pachlewski solide surmonté d'un feuillet de cellophane et obtenus après mise en culture : (A) d'un sclérote de *Cenococcum geophilum* ; (B) d'une ectomycorhize de *C. geophilum* associé à *Fagus silvatica*.

d'ectomycorhizes alors qu'un produit de 320 pb est toujours obtenu avec les isolats dérivant de la mise en culture de sclérotas. Notons que les PCR réalisées avec les amorces universelles ITS1/ITS4 donnent un produit d'amplification quelle que soit l'origine de l'isolat (sclérote ou ectomycorhize) réfutant ainsi l'hypothèse d'une mauvaise qualité des extraits d'ADN provenant des isolats dérivant des ectomycorhizes.

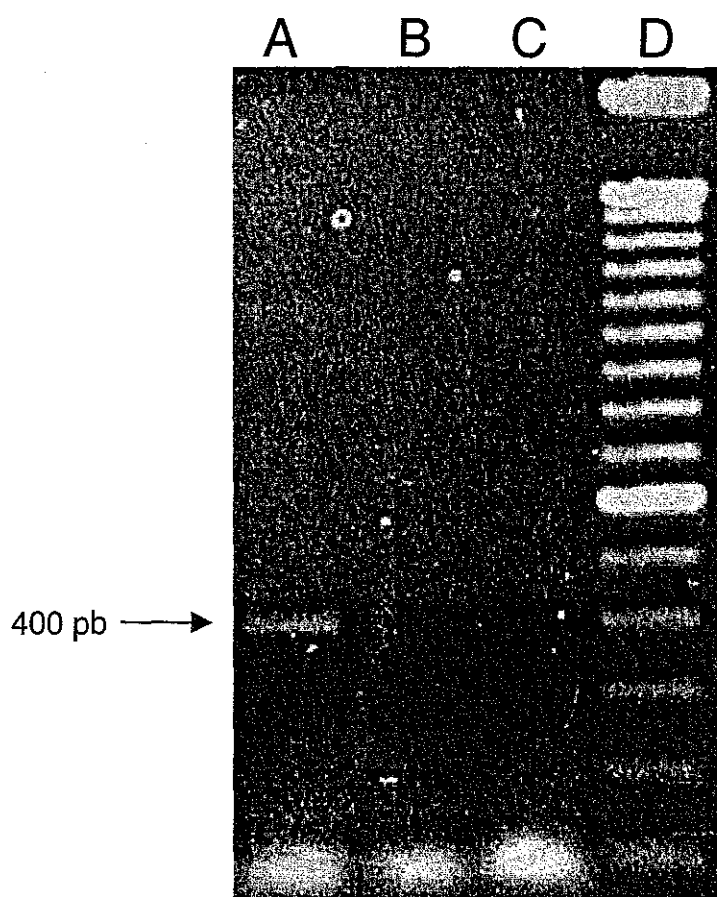
De plus, si initialement les isolats dérivant d'ectomycorhizes ont une apparence proche de celle des isolats dérivant de sclérotas, au bout de plusieurs semaines de culture leur morphologie au niveau de la frange mycelienne est profondément modifiée (Fig. I-3).

Ces deux résultats suggèrent que la mise en culture des ectomycorhizes de *C. geophilum* a conduit à l'isolement d'un champignon différent de *C. geophilum*.

#### *Relations phylogénétiques des isolats dérivant de la mise en culture d'ectomycorhizes de C. geophilum basées sur le séquençage de l'ITS de l'ADNr nucléaire*

Après séquençage de la région ITS de l'ADNr nucléaire d'un isolat (ECM1) dérivant d'une ectomycorhize de *C. geophilum* et comparaison à l'ensemble des séquences disponibles dans la banque de données GenBank (NCBI), il apparaît que cet isolat n'appartient pas au genre *Cenococcum* puisque en considérant l'ensemble ITS1-5,8S-ITS2 l'homologie la plus forte (92% ; score dans Blast : 394) est obtenue avec un isolat d'*Hymenoscyphus* sp. (numero d'accès AF252836) et qu'on ne retrouve pas de *C. geophilum* dans la liste des séquences les plus fortement homologues mais des isolats d'*Hymenoscyphus ericae*, de *Phialophora finlandia* ou encore de *Phialophora gregata* (scores dans Blast : 387, 381 et 365 respectivement).

L'analyse du dendrogramme réalisé sur la base d'une étude de parsimonie (Fig. I-2) montre que l'isolat dérivant de la mise en culture d'une ectomycorhize de *C. geophilum* (ECM1) est inclus dans un groupe comprenant *Phialophora gregata*, *Hymenoscyphus ericae* ainsi que l'isolat SIV jusqu'alors répertorié par erreur sur des critères morphologiques comme appartenant à l'espèce *C. geophilum*. Ce groupe est clairement séparé d'un second groupe englobant l'ensemble des *C. geophilum* dont nous disposons des séquences ITS. Ce groupe comprend notamment trois isolats dérivant de la mise en culture de sclérotas de *C. geophilum* isolés par nos soins pour lesquels nous avons séquencé *CGITS*. Ces trois isolats (SC1, SC2 et SC3) apparaissent dans le dendrogramme toutefois légèrement dissociés des autres *C. geophilum*. Cela pourrait être dû au fait que seule une portion de leur séquence ITS (*CGITS*) a été amplifiée puis comparée à l'ensemble des autres séquences ITS qui sont, elles, complètes. Il serait aussi possible, que ces



**Fig. I-4.** Photographie d'un gel d'agarose 1% après électrophorèse des produits d'amplification PCR réalisée avec les amorces Kinha1 et Kinha2 sur : (A) un extrait d'ADN provenant d'un isolat émanant de mise en culture d'une mycorhize de *C. geophilum* (Au total 30 isolats on été testés ; (B) un extrait d'ADN de *C. geophilum* (147-54) ; et (C) une solution sans ADN aucun. La piste (D) correspond au marqueur de taille 100 bp de Gibco-BRL.

souches isolées à partir de sclérotas de la hêtraie lorraine soit différenciées des autres isolats. Toutefois cette différenciation de l'ITS à déterminisme géographique est peu vraisemblable étant donné que les isolats d'origine suisse (ex: CGMONT, CGPIL et CGTAR) apparaissent non différenciés des isolats d'origine américaine.

#### *Amplification d'un produit PCR avec les amorces Kinha1 et Kinha2 partir d'extraits d'ADN d'ectomycorhizes de C. geophilum*

Les amorces Kinha1 et Kinha2 déduites du séquençage de l'ITS de l'isolat dérivant des ectomycorhizes de *C. geophilum* mais se montrant affines aux genres *Hymenoscyphus* et *Phialophora* ont été utilisées afin de réaliser des PCR sur 30 extraits d'ADN d'ectomycorhizes identifiées comme formées par *C. geophilum* grâce à l'utilisation des amorces CGITS1 et CGITS2. Lors de l'une de ces PCR, nous avons obtenu avec Kinha1 et Kinha2 un produit d'amplification avoisinant 400 pb (Fig. I-4).

## **Discussion**

L'utilisation d'amorces PCR spécifiques dans l'ITS de l'ADNr nucléaire permet l'identification d'une espèce en une seule étape, alors que deux étapes sont nécessaires lors d'une analyse PCR/RFLP (amplification PCR et restriction avec une ou des endonucléases). Ainsi, de nombreux travaux ont conduit à la détermination d'amorces spécifiques destinées à la détection rapide d'espèces de champignons économiquement importants. Par exemple des amorces spécifiques ont été déterminées pour différentes espèces de *Tuber* (Amicucci *et al.*, 1998) et pour *Tricholoma matsutake* (Kikuchi *et al.*, 2000) afin d'éviter les fraudes ou de contrôler des inoculations expérimentales, ou encore pour *Serpula lacrymans* (Schmidt et Moreth, 2000), un agent de l'altération du bois dont il est souhaitable d'évaluer le niveau d'infection. En plus de l'identification *sensu stricto*, des amorces spécifiques peuvent également permettre d'analyser des échantillons contenant l'ADN de plusieurs espèces, comme cela est le cas d'extraits d'ADN provenant du sol ou de mycorhizes, sans risque de compétition entre l'espèce dont on souhaite réaliser l'amplification et les autres espèces présentes.

Dans le cas de *C. geophilum* les amorces CGITS1 et CGITS2 ont permis la vérification de l'identité des ectomycorhizes prélevées et identifiées morphologiquement comme étant des ectomycorhizes de *C. geophilum*. En plus, par rapport aux amorces universelles ITS1 et ITS4, les

amorces CGITS1 et CGITS2 ont permis d'augmenter le rendement d'amplification PCR à partir d'ADN extrait d'ectomycorhizes. Nous pouvons suggérer que l'utilisation de CGITS1 et CGITS2 évite la compétition jouée par d'autres espèces de champignons associés plus ou moins intimement à la racine ectomycorhizée (Timonen *et al.*, 1997). L'obtention lors de certaines amplifications PCR avec les amorces universelles ITS1 et ITS4 d'un deuxième produit différent de l'ITS de *C. geophilum* est compatible avec cette hypothèse de compétition qui serait jouée alors par l'hôte (*Fagus silvatica*) ou éventuellement par un champignon tiers. Cette dernière proposition est confortée par le fait que la mise en culture d'ectomycorhizes de *C. geophilum* aboutisse à l'isolement d'un champignon différent de *C. geophilum*.

En effet, la comparaison de la séquence ITS du champignon isolé lors de la mise en culture de mycorhizes de *C. geophilum*, avec celles de la banque de données informatique GenBank, puis la réalisation d'un arbre phylogénétique (Fig. I-2), montrent que ce dernier est plus proche des genres *Hymenoscyphus* ou *Phialophora* que de *Cenococcum*. Il apparaît également que l'isolat SIV, précédemment considéré comme une souche de *C. geophilum* est également davantage affine aux genres *Hymenoscyphus* et *Phialophora* que de *Cenococcum*. L'obtention d'isolats différents de *C. geophilum* à partir de la mise en culture d'ectomycorhizes de *C. geophilum*, n'est donc pas uniquement survenue lors de notre travail. Notons toutefois que SIV a été isolé à partir de racines mycorhizées d'*Epicea* (par Kiffer, 1974) dans la même région (Lorraine) que celle étudiée lors de notre étude. De nombreux travaux faisant référence à *C. geophilum* reposent parfois en partie sur l'utilisation de l'isolat SIV (Martin, 1986 ; Neves-machado, 1995 ; Stülten *et al.* 1995). Il est donc important de ne pas imputer les résultats obtenus avec cette souche à *C. geophilum*.

Concernant l'origine du champignon isolé à partir des ectomycorhizes identifiées sur une base morphologique comme formées par *C. geophilum*, au moins deux hypothèses peuvent être formulées : (i) Les ectomycorhizes prélevées ne sont pas formées par *C. geophilum* mais par un champignon plus proche génétiquement des genres *Hymenoscyphus* et *Phialophora*. (ii) Un champignon affine à *Hymenoscyphus* et *Phialophora* pourrait être associé d'une manière plus ou moins intime à l'ectomycorhize formée par les deux symbiotes *C. geophilum* et *Fagus silvatica*. La première hypothèse semble plausible puisque Wilcox et Wang (1897a,b) ont préconisé un examen microscopique pour différencier les mycorhizes de *C. geophilum* de celles de *Phialophora finlandia*, et que Vralstad *et al.* (2002) ont noté une grande ressemblance entre ectomycorhizes de *C. geophilum* et d'*Hymenoscyphus ericae*. Cependant, hormis 20% d'échecs

plausiblement dus à la qualité des extraits d'ADN, les ectomycorhizes de *C. geophilum* livrent un produit d'amplification avec les amorces spécifiques CGITS1 et CGITS2. Ce résultat démontre qu'il s'agit bien d'ectomycorhizes de *C. geophilum* et suggère que lors de l'isolement à partir de ces ectomycorhizes, un champignon associé à la racine serait régénéré avec beaucoup plus d'efficacité que son partenaire symbiotique (*C. geophilum*). De plus, l'obtention d'un produit de 400 pb lors d'une PCR faite sur un extrait provenant directement d'ectomycorhizes de *C. geophilum* avec les amorces Kinha1 et Kinha2 (Fig. I-4) montre que les deux champignons sont présents dans l'environnement proche de la racine. Mais ce dernier résultat n'a été obtenu que pour un seul extrait sur un échantillon de 30. Cela laisse supposer que l'ADN du champignon affine à *Hymenoscyphus* et *Phialophora* n'est présent que dans une faible proportion d'ectomycorhizes de *C. geophilum* ; soit parce que ce champignon est juste présent en surface de l'ectomycorhize et est donc très labile, soit parce que l'éventuelle association tri-partite est relativement rare. Ce résultat est parfaitement compatible avec la seconde hypothèse (ii) : le champignon affine à *Hymenoscyphus* et *Phialophora* semble être associé à l'ectomycorhize formée par *C. geophilum* et *Fagus silvatica*. Cette association pourrait être plus ou moins intime et résulter (a) de la simple présence de mycélium du champignon tiers autour du manteau, ou (b) d'une relation parasite comme observée dans le cas des ectomycorhizes de *Lactarius subdulcis* où un ascomycète est présent dans le cortex profond (Genet, 1999) ou bien encore (c) d'une mycorhization mixte que Jumpponen *et al.* (1998) ont fréquemment observée, et Taylor et Bruns (1999) suggérée, justement dans le cas de *Phialophora*-like. Des travaux supplémentaires, et notamment d'observation microscopique des ectomycorhizes de *C. geophilum* sont dès lors nécessaires pour conclure à ce sujet.

## Chapitre II

---

## ***Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests \***

---

Jean-Luc Jany, Jean Garbaye and Francis Martin

Unité Mixte de Recherche INRA/UHP 1136 "Interactions arbres/Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54 280 Champenoux, France

**\*A paraître dans *New Phytologist* - Juin 2002**

## Introduction

At the soil-root interface, ectomycorrhizal (ECM) fungi are known to play a fundamental role in temperate and boreal forest ecosystems, by enhancing the hydro-mineral nutrition and affecting the host plant growth (Smith and Read, 1997). In these ecosystems, a single host tree may interact with hundreds of different species of ECM fungi (Taylor *et al.*, 2000; Dahlberg, 2001), each species being represented by different genotypes (Bonello *et al.*, 1998; Gherbi *et al.*, 1999; Fiore-Donno & Martin, 2001) differing in their physiological abilities which is thought to be important to ecosystem functioning (Debaud *et al.*, 1995; Cairney, 1999).

Within the ectomycorrhizal communities, the ubiquitous and cosmopolitan ascomycete *Cenococcum geophilum* Fr. is one of the dominant and most frequent ectomycorrhizal types. Horton and Bruns (2001) emphasized that there are virtually no studies where this fungus was not detected. *C. geophilum* was found to be one of the prominent fungi in fennoscandian forests with a relative abundance of 15 to 18% (Dahlberg *et al.*, 1997; Kåren *et al.*, 1997). Furthermore, Kranabetter and Wylie (1998) have found *C. geophilum* to be the most frequent ECM fungus on naturally regenerated western hemlock seedlings in northwest British Columbia. Moreover, *C. geophilum* sclerotia, hypogeous resistant propagules, have been reported to be highly abundant in soils (Dahlberg *et al.*, 1997). In northeastern France, the relative abundance of *C. geophilum* ectomycorrhizas has been estimated to be 47% in a beech forest (Blaise & Garbaye, 1983).

This abundant fungus could provide a fonctionnal asset to the colonized fine roots since several studies reported that *C. geophilum* is more resilient to drought stress than other ECM fungi (Mexal and Reid, 1973; Coleman *et al.*, 1989; Neves-Machado, 1995) and may protect roots from drought when it is involved in ectomycorrhizal symbiosis (Pigott, 1982 a,b; Neves Machado, 1996). The resistance to drought stress however varies between different isolates of *C. geophilum* (Coleman *et al.*, 1989; Neves Machado, 1996) suggesting fonctionnal heterogeneity among *C. geophilum* populations. The genetic structure of *C. geophilum* populations may thus play a fundamental role in the adaptation of the host populations to drought.

Despite this remarkable set of ecological features, little is known about the genetic structure of *C. geophilum* populations. Surveys of isolates at the world wide scale revealed a significant and unexpected genetic diversity for an asexual fungus (LoBuglio *et al.*, 1991; 1996; Shinohara *et al.*, 1999). Only few studies have dealt with genetic diversity of *C. geophilum* at the fine scale. Panaccione *et al.* (2001) showed that *C. geophilum* populations found in serpentine

**Table II-1.** Location and characteristics of the studied beech stands.

|                           | La Crête                | Amance                  | Charmois               | Hennezel               | Tendon                  |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Coordinates               | 5°21'25"E<br>48°12'15"N | 6°20'25"E<br>48°44'25"N | 6°16'12"E<br>48°6'40"N | 6°11'45"E<br>48°2'30"N | 6°41'25"E<br>48°07'15"N |
| Elevation                 | 370 m                   | 280 m                   | 400 m                  | 420 m                  | 570 m                   |
| Annual rainfall           |                         |                         |                        |                        |                         |
| 1999                      | 968 mm <sup>a</sup>     | 859 mm <sup>b</sup>     | 1207 mm <sup>c</sup>   | 1207 mm <sup>c</sup>   | 2539 mm <sup>d</sup>    |
| 2000                      | 786 mm <sup>a</sup>     | 855 mm <sup>b</sup>     | 886 mm <sup>c</sup>    | 886 mm <sup>c</sup>    | 2156 mm <sup>d</sup>    |
| Mean month<br>Temperature |                         |                         |                        |                        |                         |
| 1999                      | 10.21 °C <sup>a</sup>   | 10.30 °C <sup>b</sup>   | 10.24 °C <sup>e</sup>  | 10.24 °C <sup>e</sup>  | 10.24 °C <sup>e</sup>   |
| 2000                      | 10.73 °C <sup>a</sup>   | 10.85 °C <sup>b</sup>   | 10.90 °C <sup>e</sup>  | 10.90 °C <sup>e</sup>  | 10.90 °C <sup>e</sup>   |
| Parent material           | limestone               | loess                   | sandstone              | sandstone              | granite                 |
| Texture                   | clayey                  | loam                    | sandy loam             | sandy loam             | sandy                   |
| Humus<br>type             | eutrophic<br>mull       | mesotrophic<br>mull     | mesotrophic<br>mull    | mesotrophic<br>mull    | mor moder               |
| pH                        | 6.5                     | 4.6                     | 4.8                    | 4.4                    | 3.8                     |

<sup>a</sup> data from the closest meteorology station: Chaumont (05°39'03"E, 48°08'47"N)

<sup>b</sup> data from the closest meteorology station: Amance (6°20'25"E, 48°44'25"N)

<sup>c</sup> data from the closest meteorology station: Vittel (5°57'01"E, 48°12'09"N)

<sup>d</sup> data from the closest meteorology station: La Bresse (6°52'36"E, 48°00'24"N)

<sup>e</sup> data from the closest meteorology station: Epinal (06°27'09"E, 48°10'28"N)

and non-serpentine soils were polymorphic. These authors distinguished 12 different genotypes among 13 local isolates.

In the present study, we have analysed regional and local genetic variability of *C. geophilum* and addressed the structuration of this species between different stands of *Fagus silvatica* L. and different soil cores within each stand. Samples were collected in five different beech stands selected for their contrasting climatic and edaphic features in northeastern France. The genetic diversity has been studied by using RAPD, PCR/RFLP of the nuclear rDNA ITS and sequence analysis of a sequence characterized amplified region (*SCAR1*) on isolates originating from sclerotia. In addition, ectomycorrhizal tips were typed using PCR/RFLP of the ITS and of *SCAR1*.

## Materials and Methods

### *Beech stands, experimental soil cores and sampling pattern*

Investigations were performed on mycorrhizal roots of 80- to 100-year-old beech trees (*Fagus silvatica* L.) and on *C. geophilum* Fr. sclerotia collected from five different mature beech stands managed as regular high forest in northeastern France. These stands (about 1000 m<sup>2</sup> each) were located along a 250 km East-West transect of increasing rainfall and contrasting edaphic conditions (Table II-1). Sclerotia of *C. geophilum* and short ectomycorrhizal beech roots were collected in October 1999 and August 2000, respectively, from one dm<sup>3</sup> soil cores (10 x 10 x 10 cm) of the A<sub>1</sub> horizon (about 10 cm deep) sampled in five randomly localized areas in each stand.

### *Preparation of sclerotia and ectomycorrhizas*

Soil samples were placed in air-tight plastic bags, transported on ice to the laboratory, and stored at 4°C for less than seven days. For the preparation of ectomycorrhizas, roots were removed from the soil, gently washed in water, and fine roots were observed under a stereo-microscope. Based on the descriptions of Agerer (1995) and Ingleby *et al.* (1990), ectomycorrhizas of *C. geophilum* were identified with thick, straight, unbranched and black hyphae emanating from a black mantle. Ten *C. geophilum* ectomycorrhizas were picked per soil core (Table II-2) and individually stored in a microcentrifuge tube (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at -80°C for two months at most. For the preparation of sclerotia, soil samples from the different soil cores were sieved through a 0.4 mm sieve. The fraction remaining on the sieve was observed under a stereo-microscope. A

total of 450 sclerotia was collected over the five stands (Table II-2). They were kept in distilled water at 4°C for less than 24 hours before surface sterilisation

#### *Preparation of fungal cultures*

Sclerotia were surface-sterilised in a microcentrifuge tube in a 20% solution of a commercial disinfectant containing hypochloride (Domestos, Lever-Fabergé, Zoug, Switzerland) for 30 minutes, rinsed ten times in sterile water and individually placed on a Pachlewski agar medium (Pachlewski and Pachlewska, 1974). Mycélium arising from sclerotia was subcultured on Pachlewski agar medium every three months.

#### *DNA analyses*

*DNA extraction.* Total DNA was extracted directly from single ectomycorrhizas or from 10 mg of pure culture mycelium using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions.

*RAPD.* RAPD amplification was carried out in duplicate under conditions specially designed to enhance reproducibility (Selosse *et al.* 1998). The components of the 25 µl PCR mix were: 10 ng of DNA, 1.84 µM of the 152C primer (5'-CGCACCGCAC-3') (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 200 µM dNTP (Qbiogene, Illkirch, France), 1x *Taq* DNA polymerase incubation buffer and 3 units of 15U *Taq* DNA polymerase (Qbiogene). The reactions were done in a Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermocycler (Perkin Elmer Instruments, CT, USA) under the following cycling parameters: initial denaturation at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 0.5 min, annealing at 55°C for 0.5 min and extension at 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 10 min. Products were analysed on 2% agarose gels in 1% TBE (Tris buffer-EDTA). Controls with no DNA were included in each series in order to test for the presence of contaminants in reagents and reaction buffers.

*RAPD data analysis.* RAPD intense bands in the 500-1500 bp size range that reproduced consistently for the two replicates were scored for each individual sclerotial isolate. Electrophoregrams of the different samples were compared side by side. RAPD was scored as presence (1) or absence (0) of a band and a matrix of RAPD phenotypes was built. This rectangular matrix of individuals RAPD markers was transformed to a resemblance matrix using

Jaccard similarity coefficient and used for a Neighbor-Joining (NJ) analysis to produce a dendrogram for which the robustness of the topology was assessed by bootstrap (500 iterations) (FreeTree program, Pavlicek *et al.*, 1999; available at: <http://www.natur.cuni.cz/~flegr/programs/freetree>).

The effect of spatial separation on genetic structure was tested by a regular Mantel test (Mantel & Valand, 1970) on the resemblance (RAPD pattern similarity) matrix and a Euclidean matrix of metric distance between the sampling plots (MANTEL module in the R Package). The significance of the correlation between the two matrices was tested by 9999 random permutations of the similarity matrix to generate a null distribution of correlation coefficients (z values). A significant result was inferred if  $\geq 95\%$  of the randomly generated statistics were greater than the observed value.

Based on the number of individual RAPD phenotypes, the proportion of distinguishable RAPD phenotypes ( $PD$ ) consisting in the total number of unique RAPD patterns divided by the isolate number (Ellstrand & Roose, 1987) was calculated as a descriptor of the diversity within the sample. Estimate of phenotypic diversity and partitioning of the RAPD variation were carried out using the Shannon index (Lewontin, 1972). This method does not require the Hardy-Weinberg in order to determine the phenotypic diversity assumptions (Fritsh & Rieseberg, 1996); this is very important considering that there is little information available about reproduction of *C. geophilum*. The calculation of the Shannon index, originally proposed as a measure of the information content in a code (Shannon & Weaver, 1949), is based on number and frequency of markers for each RAPD phenotype (Lewontin, 1972). Shannon index is defined as:  $H_o = -\sum p_i \cdot \log_2 p_i$ , where  $p_i$  is the frequency of a given RAPD band. It is used to quantify the degree of within-population diversity. The average diversity over the different populations was calculated from  $H_o$  as:  $H_{pop} = 1 / n \sum H_o$ , where  $n$  is the number of populations. The diversity in all the populations considered together  $H_{sp}$ , was calculated from the phenotypic frequencies  $p$  ( $-\sum p \cdot \log_2 p$ ) as:  $H_{sp} = -\sum p_s \log_2 p_s$ , where  $p_s$  is the frequency of presence or absence of the RAPD band in the whole sample (42 individuals in this case). Thus, the component of diversity within populations is  $H_{pop} / H_{sp}$  and the component between populations is  $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$  which is also referred as  $G'_{st}$ .

*Sequencing of SCAR1.* A cloned DNA fragment corresponding to a 620 bp RAPD product occurring on 36 isolates of the 42 sclerotial isolates tested was sequenced using the BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) and an ABI genotyper 310 automated sequencer (Applied Biosystems, CA, USA). A couple of primers, OSCAR11 (5'-AGGTATTCAGTGATCCGCGG-3') and OSCAR12 (5'-GGTGACTTTGGTGTCTCC-3'), was designed using the Primer Selection program (<http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html>) for amplifying *SCAR1*. These primers were synthesised and supplied by Invitrogen (Invitrogen, CA, USA) and used for amplifying and sequencing eleven *SCAR1* sequences. These sequences are available in the GenBank database (NCBI), under the following access numbers: AF414847 to AF414857. Sequences were aligned using the MultAlin program (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>) (Corpet, 1988).

*Design of C. geophilum ITS specific primers.* The PCR amplification of the rDNA ITS of mycelium originating from black *Cenococcum*-like ectomycorrhizas using the universal ITS primers ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990) indicated that multiple fungal endophytes (e.g. *Phialophora* sp.) occurred in beech ectomycorrhizal tips (data not shown). As a consequence, we have designed two *Cenococcum*-specific primers CGITS1 (5'-TGACGATTGACTCATGTTGC-3') and CGITS2 (5'-TTCAAAGCGAAAGATTCTGC-3'), based on the multialignment of *C. geophilum* ITS sequences available in GenBank (NCBI), under the following access numbers: Z11998, Z48521 and Z48523 to Z48537. The two primers CGITS1/CGITS2 were synthesised and supplied by Invitrogen for amplifying a portion of the ITS referred to as *CGITS*.

*PCR/RFLP.* Amplifications of *CGITS*, and *SCAR1* were performed under the following conditions: unquantified DNA samples were added to a mix containing: 0.6  $\mu$ M of each primer (Invitrogen), 200  $\mu$ M dNTP (Qbiogene) and 2.5 units of REDTaq DNA polymerase (SIGMA, MO, USA) and 1x REDTaq PCR Reaction Buffer solution. PCR were performed in a Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermocycler (Perkin Elmer Instruments) under the following cycling parameters: initial denaturation at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 0.5 min, annealing at 50°C for 0.5 min and extension at 72°C for 2 min, with final extension at 72°C for 10 min. Twenty microliters of PCR products were digested at 37°C during 5 hours using 10 units of *HinfI* enzyme (Qbiogene), and restriction products were analysed on 8% acrylamide gels.

**Table II-2.** Samplings from the five beech stands and successful DNA typing analyses of ectomycorrhizas and sclerotia-derived isolates.

| Stand    | Plot # | Ectomycorrhizas sampled | Ectomycorrhizas typed | Sclerotia sampled | Sclerotia-derived isolates typed |
|----------|--------|-------------------------|-----------------------|-------------------|----------------------------------|
| La Crête | 1      | 10                      | 4                     | 20                | 1                                |
|          | 2      | 10                      | 1                     | 20                | 1                                |
|          | 3      | 10                      | 3                     | 20                | 0                                |
|          | 4      | 10                      | 0                     | 20                | 1                                |
|          | 5      | 10                      | 10                    | 20                | 1                                |
| Amance   | 1      | 10                      | 10                    | 10                | 0                                |
|          | 2      | 10                      | 10                    | 10                | 1                                |
|          | 3      | 10                      | 10                    | 10                | 1                                |
|          | 4      | 10                      | 10                    | 10                | 1                                |
|          | 5      | 10                      | 10                    | 10                | 1                                |
| Charmois | 1      | 10                      | 10                    | 20                | 2                                |
|          | 2      | 10                      | 6                     | 20                | 1                                |
|          | 3      | 10                      | 10                    | 20                | 3                                |
|          | 4      | 10                      | 10                    | 20                | 1                                |
|          | 5      | 10                      | 10                    | 20                | 2                                |
| Hennezel | 1      | 10                      | 10                    | 20                | 5                                |
|          | 2      | 10                      | 7                     | 20                | 3                                |
|          | 3      | 10                      | 10                    | 20                | 2                                |
|          | 4      | 10                      | 5                     | 20                | 2                                |
|          | 5      | 10                      | 4                     | 20                | 7                                |
| Tendon   | 1      | 10                      | 8                     | 20                | 2                                |
|          | 2      | 10                      | 6                     | 20                | 1                                |
|          | 3      | 10                      | 5                     | 20                | 1                                |
|          | 4      | 10                      | 1                     | 20                | 2                                |
|          | 5      | 10                      | 3                     | 20                | 0                                |
| Total    |        | 250                     | 173                   | 450               | 42                               |

## Results

### *Genetic variability of C. geophilum assessed by sclerotia typing*

*RAPD of sclerotia-derived mycelium.* Cultures from *C. geophilum* sclerotia, collected from the five beech stands (Table II-1), yielded 42 mycelial cultures (average yield = 9.5%). RAPD produced an average of 16 detectable and reliable DNA bands per sample in the 500-1500 bp size range. A total of 18 different multilocus RAPD phenotypes were identified among the 42 isolates analysed; the proportion of distinguishable genets (*PD*) was 0.42. One RAPD phenotype was prominent and comprised 15 individuals collected in the Charmois and Hennezel beech stands.

Similarity between genets was assessed by NJ analyses of a binary matrix produced from RAPD patterns (Fig. II-1). The tree topology indicated that RAPD phenotypes from Hennezel (H) and Charmois (CHA), two stands 12.5 km apart, sharing similar climatic and edaphic features, mostly grouped together, whereas isolates from Amance (AM), Tendon (TD) and La Crête (Cre) were not clearly separated. The overall correlation between physical and genetic distance matrices was  $r = 0.49$  and significant at  $P < 0.001$  (Mantel's test, 9999 permutations), suggesting that spatial distance between the sampling sites may play a role in structuring the *C. geophilum* populations. The phenotypic variation between *C. geophilum* genets can be partitionned into within-stand and between-stand components. Even if the Shannon index has been used for analysis of populations with both small and variable numbers of individuals: seven to 16 in Wolff *et al.* (1997), or seven to 41 in Cardoso *et al.* (1998), Bussell (1999) noticed that Shannon index may not be appropriate if the number of individuals per population is small and/or varies. Therefore, we calculated  $H'_{pop}$  and  $H'_{sp}$  both with the overall data set and with only the three largest populations (excluding La Crête and Amance populations consisting of four individuals only).  $H'_{pop}$  and  $H'_{sp}$  (Table II-3) were found to be similar in both cases and revealed that the total variation was evenly partitionned between inter-population and intra-population variations.

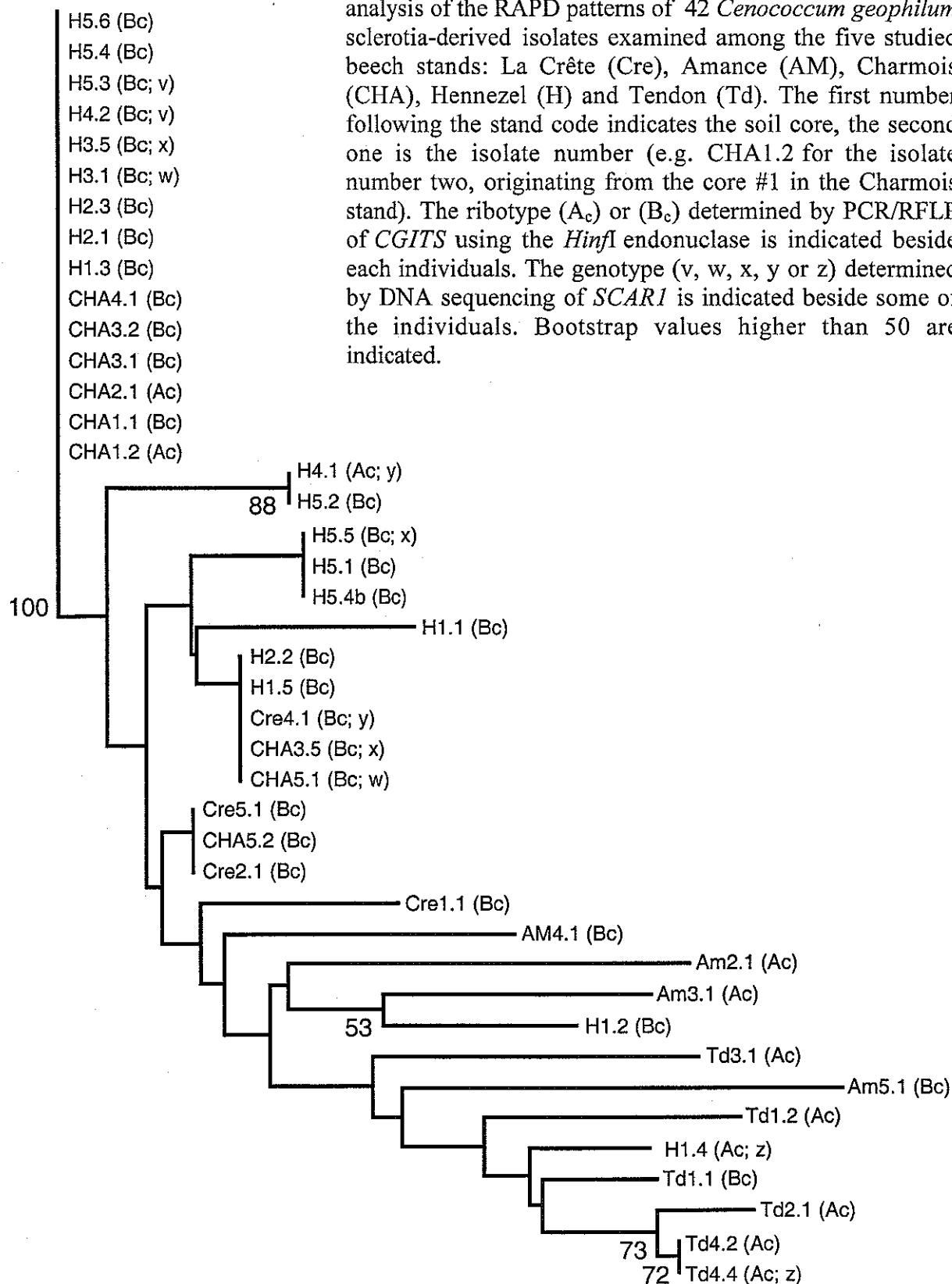
*PCR/RFLP of the rDNA ITS.* The analysis of *CGITS* variability by PCR/RFLP, yielded two different patterns among the 42 tested sclerotia-derived isolates. The first one ( $A_c$ ) consisted in two bands of 170 and 150 bp, while the second one ( $B_c$ ) was a three-band pattern including 150, 90 and 80 bp fragments. Some individuals sharing the same RAPD phenotype can be distinguished considering their ITS-type. For example, isolates CHA1.2 and CHA2.1 were discriminated from the other individuals grouped in a 15 individual RAPD cluster (Fig. II-1).

**Table II-3.** Partitioning of genetic diversity among sclerotia-derived isolates of *C. geophilum* at different beech stands in northeastern France revealed by the calculation of the Shannon's indices

| Population<br>number | $H'_{pop}$ | $H'_{sp}$ | $(H'_{sp} - H'_{pop}) / H'_{sp}$ | $H'_{pop} / H'_{sp}$ |
|----------------------|------------|-----------|----------------------------------|----------------------|
|                      |            |           | between stands                   | within stands        |
| 5                    | 2.69       | 4.64      | 0.42                             | 0.58                 |
| 3 <sup>a</sup>       | 2.29       | 4.16      | 0.45                             | 0.55                 |

<sup>a</sup> Shannon indices were calculated without data from La Crête and Amance populations consisting of four isolates only.

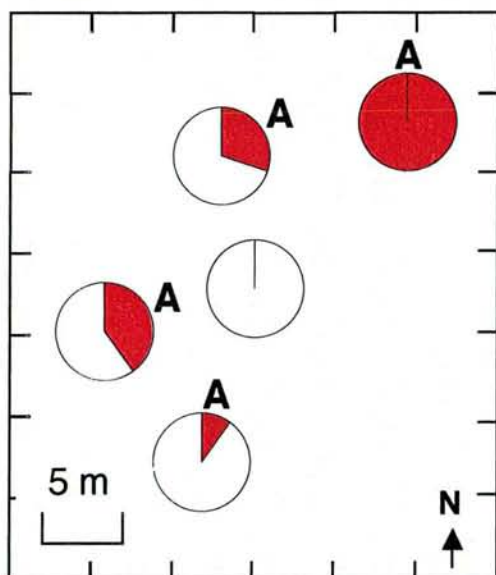
**Fig. II-1.** Dendrogram produced by a Neighbor-Joining analysis of the RAPD patterns of 42 *Cenococcum geophilum* sclerotia-derived isolates examined among the five studied beech stands: La Crête (Cre), Amance (AM), Charmois (CHA), Hennezel (H) and Tendon (Td). The first number following the stand code indicates the soil core, the second one is the isolate number (e.g. CHA1.2 for the isolate number two, originating from the core #1 in the Charmois stand). The ribotype (A<sub>c</sub>) or (B<sub>c</sub>) determined by PCR/RFLP of *CGITS* using the *Hinf*I endonuclease is indicated beside each individuals. The genotype (v, w, x, y or z) determined by DNA sequencing of *SCAR1* is indicated beside some of the individuals. Bootstrap values higher than 50 are indicated.



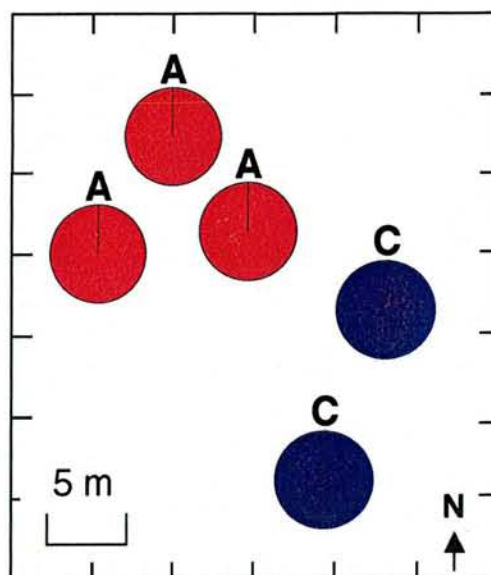
*DNA sequencing of SCAR1.* Sequencing of *SCAR1* was successful on 11 isolates amongst the 42 tested by RAPD. *SCAR1* showed no homology to known sequences in the DNA databases. A multialignment of the 11 *SCAR1* sequences (available in the PopSet database (NCBI) under the following access number: 15983024) led to the identification of 35 polymorphisms (32 single nucleotide polymorphisms and three insertion/deletion of respectively 10, 16 and 17 bp) allowing to distinguish five different genotypes (v, w, x, y and z). Although the number of *SCAR1* polymorphisms was high, *SCAR1* sequences of the genotypes v, w and x only differ by one nucleotide. Individuals sharing the same RAPD pattern and the same ITS-type can be further distinguished by their *SCAR1* polymorphism. For example, CHA3.5, CHA5.1 and Cre4.1 shared the same RAPD pattern and the same ITS-type (B<sub>c</sub>), but exhibit three different *SCAR1* sequences (w, x and y, respectively). Amongst the 42 sclerotia-derived isolates, 24 genets were discriminated using RAPD phenotypes, PCR/RFLP of ITS and *SCAR1* sequencing; the *PD* value was 0.57.

*Genetic variability of C. geophilum assessed by typing of ectomycorrhizal tips*

PCR/RFLP of *CGITS* was successful for 173 ectomycorrhizal tips among 250 sampled ones. The DNA extracts (77) for which PCR did not yield any product may be of poor quality or may originate from black ectomycorrhizas belonging to species not recognized by *CGITS* or *SCAR1* primers. The analysis of the 173 ectomycorrhizal tips sampled in the five different beech stands, yielded two patterns (A<sub>c</sub> and B<sub>c</sub>) similar to those observed for sclerotia-derived isolates. Three restriction patterns of *SCAR1* were obtained with the *HinfI* endonuclease. The first one (A<sub>s</sub>) corresponded to the single undigested 450 bp initial fragment. The second pattern (B<sub>s</sub>) consisted in two bands of 230 and 180 bp. The third one (C<sub>s</sub>) was a three-band pattern that simultaneously displayed the 450 bp uncut fragment and the 230 and 180 bp products. For the isolates exhibiting the three-band pattern, we increased the amount of *HinfI* enzyme up to 25 units, and/or the duration of the reaction up to 12 hours, but the upper 450 bp fragment remained uncut, suggesting the existence of two *SCAR1* alleles. Combining the data of PCR/RFLP of *CGITS* and *SCAR1* resulted in the discrimination of five different genotypes (A to E) of *C. geophilum* forming ectomycorrhizas in the investigated beech stands. Sequencing of *CGITS* and *SCAR1* was not possible due to the low amount of DNA material available.

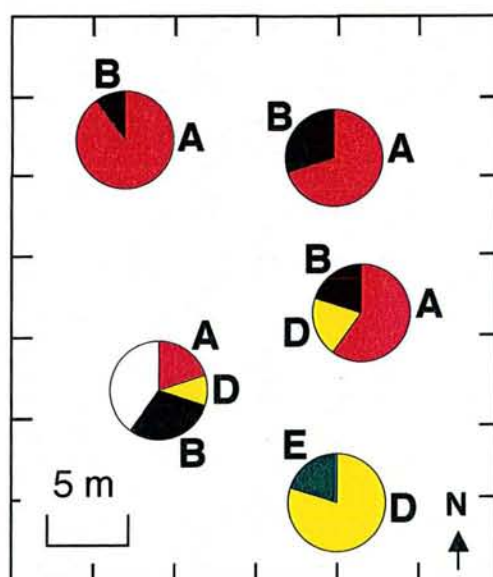


**La Crête** (5°21'25" E; 48°12'15" N)

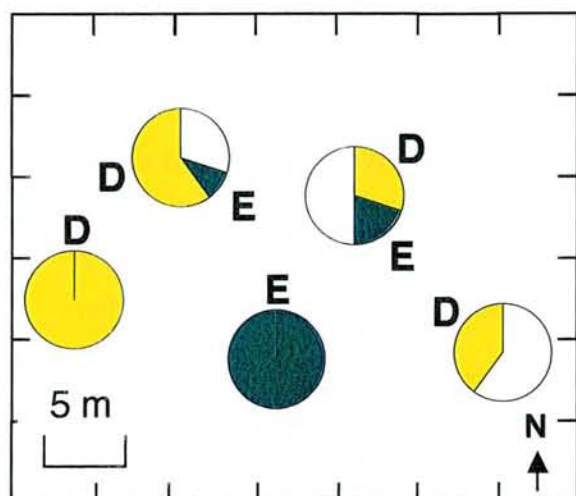


**Amance** (6°20'25" E; 48°44'25" N)

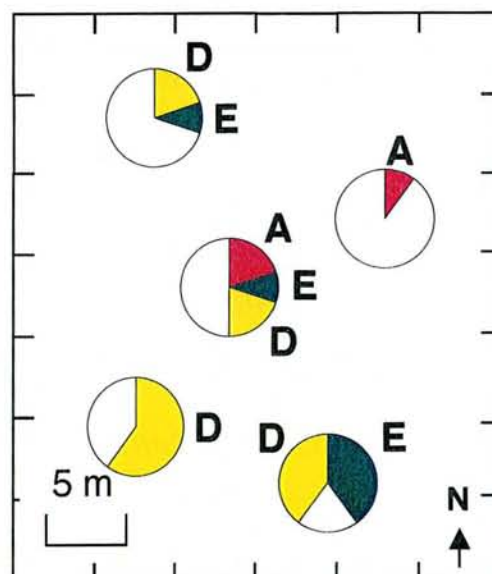
10 samples



**Charmois** (6°16'12" E; 48°6'40"N)



**Hennezel** (6°11'45" E; 48°2'30"N)



**Tendon** (6°41'25" E; 48°07'15" N)

**Fig. II-2.** Distribution of the five different genotypes of *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizas within the five studied beech stands: La Crête, Amance, Charmois, Hennezel and Tendon. Genotyping was performed by combining PCR/RFLP of *CGITS* and *SCAR1* using the *HinfI* endonuclease. A pie-chart is centered on each of the five soil cores (10 x 10 x 10 cm) sampled per beech stand. The different sectors of the pie-chart indicate the number of the five different genotypes (A: red, B: black, C: blue, D: yellow and E: green) among the ten ectomycorrhizas sampled from the soil core. White sectors are used for samples for which PCR/RFLP of *CGITS* or *SCAR1* was unsuccessful either because they were not *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizas or due to poor quality of the DNA extract.

The five genotypes were unevenly distributed among and within the various beech stands (Fig. II-2). A single genotype (A) was detected in the La Crête stand; however the yield of the PCR analysis was the lowest from our study (36%). The number of detected genotypes was higher for the other stands: two in the Amance (A, 60% and C, 40%) and Hennezel (D, 64% and E, 36%) stands, three in Tendon (A, 13%; D, 61% and E, 26%) and up to four for the Charmois stand (A, 52%; B, 20%; D, 24% and E, 4%). Several genotypes were specific for a stand; C type was only found in the Amance stand and B type was only sampled in the Charmois stand. The D and E types were only sampled in the Tendon, Hennezel and Charmois stands.

At the intra-stand scale, several ectomycorrhizal genotypes were found to coexist in a single one dm<sup>3</sup> core (Fig. II-2). Two types (E and D) were detected in two different cores in the Hennezel and Tendon stands and in three cores in the Charmois stand. Up to three genotypes were found in one core in the Tendon stand (types A, D and E) and in two cores in the Charmois stand (types A, B and D).

## Discussion

### *Genetic variability of C.geophilum at the regional scale*

Genetic variability has previously been reported for *C. geophilum* (LoBuglio *et al.*, 1991). These authors discriminated 32 genotypes by analysing RFLP of the whole rDNA repetitive units of 71 *C. geophilum* isolates from worldwide origin. The same isolates were divided by RFLP into 20 rDNA ITS types (Shinohara, 1994 cited by LoBuglio *et al.*, 1996). Furthermore, a PCR/RFLP study of the ITS of 19 *C. geophilum* isolates at the worldwide scale led to the discrimination of four genotypes (Farmer & Sylvia, 1998). More recently, Panaccione *et al.* (2001) reported a high local diversity in serpentine and non-serpentine soils. These authors distinguished 12 different genotypes among 13 local isolates.

In the present study, we also observed a high level of genetic diversity within *C. geophilum* populations at the regional scale, within five contrasted stands located in mature and homogeneous beech forests in northeastern France. RAPD carried out on 42 sclerotia-derived isolates of *C. geophilum* identified 18 different RAPD phenotypes. Furthermore, considering the *CGITS* types and *SCAR1* sequence haplotypes, 24 genotypes were finally distinguished. The proportion of distinguishable genets ( $PD = 0.57$ ) was within the range of values obtained for fungi for which sexual reproduction plays a key role (e.g.  $PD = 0.61$  for *Laccaria amethystina*;

Gherbi *et al.*, 1999). Ectomycorrhizal species relying mostly on vegetative growth, such as *Xerocomus chrysenteron* (Fiore-Donno & Martin, 2001) shows much lower *PD* values (0.007).

Although the presence of the host-plant DNA in ectomycorrhizal tips precluded the use of RAPD, PCR/RFLP analyses of *CGITS* and *SCAR1* detected a minimum estimate of five *C. geophilum* genotypes among the 173 ectomycorrhizas collected in the five different beech stands.

The high level of genetic diversity of *C. geophilum* populations investigated in northeastern France was confirmed by statistical analysis; the Shannon's diversity index ( $G'_{ST}$ ) was 0.42. As *C. geophilum* has no known sexual stage, this wide genetic diversity was unexpected. Nevertheless many fungi, thought to spread by asexual means exhibit a high degree of genetic variability, e.g. plant pathogens such as *Magnaporthe grisea* (Zeigler *et al.*, 1997) and *Botrytis elliptica* (Huang *et al.*, 2001) or plant symbionts as *Glomus* spp. (Lloyd Macgilp *et al.*, 1996). Such a genetic variability could be due whether to cryptic sex, as shown in the human pathogen *Coccidioides immitis* (Burt *et al.*, 1996), to high-level of somatic mutations (Milgroom, 1996), or to parasexuality events (Milgroom, 1996; Zeigler *et al.*, 1996; Anderson & Kohn, 1998; Taylor *et al.*, 1999). The calculation of linkage disequilibrium between alleles at different co-dominant loci such as *SCAR1*, will provide further data to test for the occurrence of recombination events in *C. geophilum*.

#### *Spatial distribution of genotypes of C. geophilum at the inter-stand scale*

A subdivision in *C. geophilum* populations was indicated by the inter-population variation in sclerotia-derived mycelia. This inter-population variation was as large as the intra-population variation, as calculated using Shannon index (Table II-3). A significant Mantel's test ( $r = 0.49$ ,  $P \leq 0.0001$ ) suggested that spatial distance contributes to the structuration of *C. geophilum* populations. This contention is in accordance with the NJ tree topology which indicated that genets from the Hennezel and Charmois stands, located 12.5 Km apart and sharing similar mid-ranged climatic and edaphic features, were grouped together. However, because the most resembling stands were also the less distant ones (e.g. Hennezel and Charmois), it is not possible to determine whether distance and/or stand ecological features are the major factors affecting genetic variation.

The five genotypes detected by PCR/RFLP of ectomycorrhizal tips were also unevenly distributed among the beech stands. In the most acidic soils, as found in the Tendon and Hennezel stands (42 Km apart), the D and E genotypes were prominent, whereas in the less

acidic soil of Amance and in the calcareous soil of La Crête (96 Km apart) the A genotype was the dominant one. Genet (1999) has already reported morphological and anatomical differences between *C. geophilum* mycorrhizas colonizing either a calcareous and basic soil or an acidic soil. These data suggest that the soil characteristics might play a role in structuring *C. geophilum* populations as proposed by Diez *et al.* (2001) who argued that the soil features are a major ecological factor that may account for the variability of *Pisolithus* isolates in the native Mediterranean vegetation. Natural selection of genotypes adapted to local conditions (Ennos & McConnell, 1995) can contribute to subdivision in populations as found for *C. geophilum* by Panaccione *et al.* (2001): These authors showed that populations of *C. geophilum* established in serpentine soil and non-serpentine soil were genetically different and proposed that adapted genotypes colonized serpentine soils.

The differences in ecological features of the beech stands, as well as geographic isolation, amplified by the limited capacity to dispersal of *C. geophilum* soil-borne sclerotia, may contribute to the observed genetic structure. Studying distant beech stands sharing similar edaphic features and estimating gene flow by using a set of co-dominant markers as *SCAR1* would allow to evaluate the relative contribution of these factors.

#### *Spatial distribution of genotypes of C. geophilum at the intra-stand scale*

The important within-population variance, calculated from RAPD phenotypes supports the interpretation that *C. geophilum* populations are also structured at the stand level. Among the five PCR/RFLP types of ectomycorrhizas, up to four types were detected within the same stand (e.g. Charmois) and up to three types appeared in the same one dm<sup>3</sup> core (e.g. soil core 3 in Tendon) (Fig. II-2). Therefore, several genotypes may coexist within the same limited soil. Even if the sampling procedure used in the present study precluded the determination of the genet size, the present data suggest that *C. geophilum* did not fit with the model of low-numbered and exclusive genotypes one should expect for an ectomycorrhizal fungus that lacks meiospore production. However, *C. geophilum* produces sclerotia which can be transported by water, birds, insects or rodents (Massicotte, 1992). We therefore suggest that *C. geophilum* do not extend exclusively by vegetative mycelial growth, but that sclerotia are responsible to a large extent for its fine-scale dissemination, possibly leading to multiple and mixed genotypes resulting from putative recombination events.

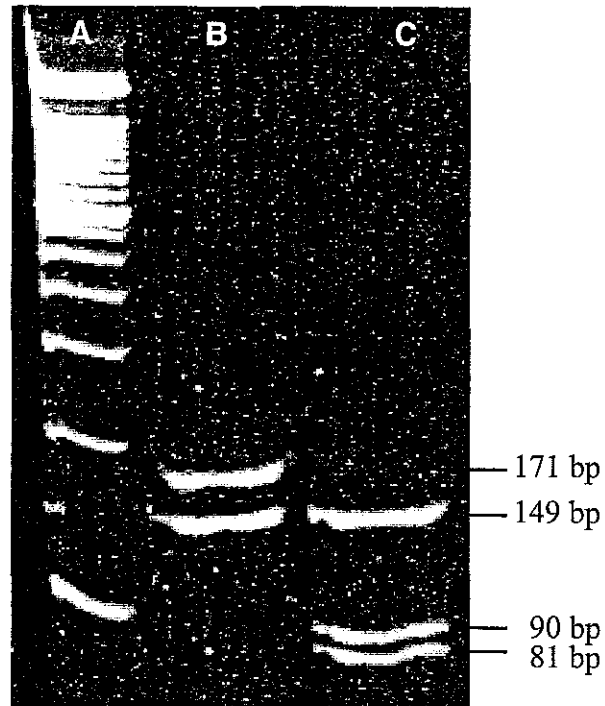
Further analyses are required to explain the origin of the genetic variation observed within *C. geophilum*. Recombination events are expected, but whether there are due to parasexuality or to the existence of a cryptic sexual state still have to be determined. In addition, population analysis over time and with a spatial scale properly adjusted to define the structuration of genets will shed new light on our understanding of the fine genetic structure of *C. geophilum*.

## **Acknowledgments**

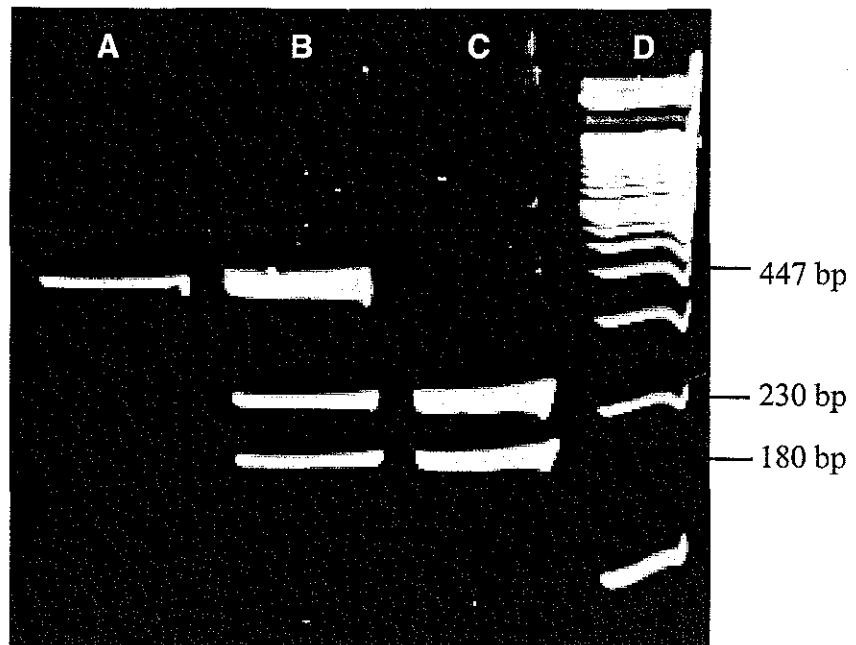
This study was part of JL Jany's PhD. project funded by a scholarship from the Office National des Forêts (O.N.F.) and the Région Lorraine. Funding was provided to JG and FM by O.N.F. and INRA (Action Transversale "Typage des bio-agresseurs et des symbiotes") and by the C.N.R.S. program "Environnement, vie et sociétés" managed by the Institut Français de Biodiversité. The research utilized in part the DNA sequencing facilities at INRA-Nancy financed by the INRA and the Région Lorraine. We thank J.L. Churin and P. Vion for their assistance in the field surveys, M.A. Selosse and D. Tagu for critical reading of the manuscript, and J. Díez for stimulating discussions.

## Annexe II-1

Electrophorèse en gel de polyacrylamide 8% montrant les deux types de profils obtenus avec des extraits d'ADN de *C. geophilum* lors de PCR/RFLP réalisées après amplification PCR avec les amorces CGITS1 et CGITS2 puis digestion des produits d'amplification par l'enzyme de restriction *Hinf*I. (A) marqueur de taille 100bp (Gibco-BRL) ; (B) profil A<sub>c</sub> ; (C) profil B<sub>c</sub>.



Electrophorèse en gel de polyacrylamide 8% montrant les trois types de profils obtenus avec des extraits d'ADN de *C. geophilum* lors de PCR/RFLP réalisées après amplification PCR avec les amorces OSCAR11 et OSCAR12 puis digestion des produits d'amplification par l'enzyme de restriction *Hinf*I. (A) profil A<sub>s</sub> ; (B) profil C<sub>s</sub> ; (C) profil B<sub>s</sub> ; (D) marqueur de taille 100bp (Gibco-BRL)



***Deuxième Volet : Caractérisation  
physiologique des populations de *Cenococcum  
geophilum* au sein de la hêtraie Lorraine,  
résistance au stress hydrique de *C. geophilum****

## **Chapitre III**

---

# **Respiration activity of ectomycorrhizas from *Cenococcum geophilum* and *Lactarius* sp. in relation with soil water potential in beech forests \***

---

Jean-Luc Jany, Francis Martin and Jean Garbaye

Unité Mixte de Recherche INRA / UHP 1136 "Interactions Arbres / Micro-organismes", Centre  
INRA de Nancy, 54 280 Champenoux, France

**\* Soumis pour publication dans *Plant and Soil***

## Introduction

At the soil-root interface of temperate and boreal forest ecosystems, ectomycorrhizal (ECM) fungi are known to play a fundamental role, by enhancing the hydromineral nutrition of the host plant and promoting its growth. ECM fungi are particularly well adapted to mobilise sparse heterogeneous resources such as mineral cations, phosphorus and nitrogen from the soil (Smith and Read, 1997). They also play an important role in the water status of trees (Garbaye and Guehl, 1997; Morte *et al.*, 2001).

These functions are ensured by a high diversity of fungi, since a single host tree may interact with hundreds of ECM fungal species (Taylor *et al.*, 2000; Dahlberg, 2001), each species being represented by different genotypes (Debaud *et al.* 1995). This high biodiversity of ECM fungi corresponds to a broad range of complementary functional abilities which is thought to be important to ecosystem functioning (Cairney, 1999; Baxter and Dighton, 2001; Leake, 2001). As stated by Loreau *et al.* (2001), at least a minimum number of species is essential for ecosystem functioning under constant conditions and a larger number of species is probably essential for maintaining the stability of ecosystems processes in changing environment.

The increasing availability of powerful molecular markers has led to the extensive study of the genetic structure of ECM communities (Horton and Bruns, 2001; Dahlberg, 2001). This is running ahead of our ability to understand the biological meaning of the genetic variability (Read, 2000). Moreover, inter- (and intra-) specific differences in the functional roles played by ECM fungi in forest ecosystems remain poorly studied. Little is known about *in situ* physiological activities of ECM fungi as a result of technical difficulties (Buscot *et al.*, 2000) and experimental confounding factors (Leake, 2001). ECM communities undergo quick shifts of their functional guilds in response to rapid variations occurring in the environment (Peter *et al.*, 2001; Lilleskov *et al.*, 2001), which never provides optimal conditions except for very brief, transient periods. This is a major difficulty in assessing the functional role of the ECM community in forest ecosystem functioning on the long term.

Water availability is the main environmental factor limiting tree growth in temperate forest ecosystems. The mechanisms by which the fungus modifies host-plant water relations remains poorly known, and studies addressing this question have mainly considered endomycorrhizal fungi (for a review see Augé, 2001). Nevertheless, the water status is seemingly modified by ectomycorrhizal fungi either by a direct effect on water uptake (Agerer, 1991;

Unestam & Sun, 1995; Garbaye & Guehl, 1997; Muhsin and Zwiazek, 2001) and nutrient uptake (Morte *et al.*, 2000) or by an indirect effect through stomatal (Mason *et al.*, 1999; Morte *et al.*, 2000; Nardini *et al.*, 2000; Morte *et al.* 2001) or osmotic (Wartinger *et al.*, 1994) regulations. Increasing interest is currently addressed to the effects of the global climate change in ecosystem functioning, and several evidences indicate that a deeper understanding of root dynamics (Norby and Jackson, 2000) and shifts in mycorrhizal communities (Treseder and Allen, 2000) are critical to describing the integrated response of ecosystems. In northeastern France, the crisis which occurred in the 90's in beech vitality in lowland areas was apparently mainly due to water shortage (Badeau *et al.*, 1997), and questions about the role of the ECM communities under such water-stress conditions should be addressed. The ECM communities have been well described in these lowland beech forests: Voiry (1981) reported the frequent occurrence of 43 morphological-types, with a prominence of *Cenococcum geophilum*, *Lactarius* sp. and *Hebeloma* sp.. Blaise and Garbaye (1983) also described *C. geophilum* to be the most frequent (43% of relative abundance) ECM fungus in these forests.

The abundance of the ubiquitous and cosmopolitan ascomycete *C. geophilum* might provide a decisive advantage to beech root systems since several studies reported that some *C. geophilum* isolates were more resistant to drought than many other ECM fungi (Mexal and Reid, 1973; Theodorou, 1978; Coleman *et al.*, 1989; Neves-Machado, 1995). Still, while the pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress has been well studied (Mexal and Reid, 1973, Coleman *et al.*, 1989, Neves Machado, 1995), fewer studies dealt with the *in situ* behaviour of different ECM morphotypes facing limiting water conditions. Pigott (1982b), by observing the fine structure of *C. geophilum* ectomycorrhizas using electron micrography, showed that they interestingly remained alive throughout long periods of drought and pointed out that this resistance was apparently related to the ability of the fungal partner to withstand dessication (Pigott, 1982a). We therefore hypothesized that the better drought resistance of *C. geophilum* would preserve the functional status of the *C. geophilum* ectomycorrhizal tips. Thus, in post-drought periods, *C. geophilum* ectomycorrhizas, unlike other morphotypes, would be readily fully able to absorb available water again. Colonisation by *C. geophilum* would constitute a major advantage for roots in post-drought periods.

Simple tests to assess the vitality (*i.e.*, physiological status) of ectomycorrhizas originating from the field are lacking (Niederer *et al.*, 1989). In the present study, we have used a micro-radiorespirometry approach (Al Abras *et al.*, 1988) sensitive enough to assess the

**Table III-1.** Location and characteristics of the studied beech stands.

|                           | La Crête                | Amance                  | Charmois               | Hennezel               | Tendon                  |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Coordinates               | 5°21'25"E<br>48°12'15"N | 6°20'25"E<br>48°44'25"N | 6°16'12"E<br>48°6'40"N | 6°11'45"E<br>48°2'30"N | 6°41'25"E<br>48°07'15"N |
| Elevation                 | 370 m                   | 280 m                   | 400 m                  | 420 m                  | 570 m                   |
| Annual rainfall           |                         |                         |                        |                        |                         |
| 1999                      | 968 mm <sup>a</sup>     | 859 mm <sup>b</sup>     | 1207 mm <sup>c</sup>   | 1207 mm <sup>c</sup>   | 2539 mm <sup>d</sup>    |
| 2000                      | 786 mm <sup>a</sup>     | 855 mm <sup>b</sup>     | 886 mm <sup>c</sup>    | 886 mm <sup>c</sup>    | 2156 mm <sup>d</sup>    |
| Mean month<br>Temperature |                         |                         |                        |                        |                         |
| 1999                      | 10.21 °C <sup>a</sup>   | 10.30 °C <sup>b</sup>   | 10.24 °C <sup>c</sup>  | 10.24 °C <sup>c</sup>  | 10.24 °C <sup>c</sup>   |
| 2000                      | 10.73 °C <sup>a</sup>   | 10.85 °C <sup>b</sup>   | 10.90 °C <sup>c</sup>  | 10.90 °C <sup>c</sup>  | 10.90 °C <sup>c</sup>   |
| Parent material           | limestone               | loess                   | sandstone              | sandstone              | granite                 |
| Texture                   | clayey                  | loam                    | sandy loam             | sandy loam             | sandy                   |
| Humus<br>type             | eutrophic<br>mull       | mesotrophic<br>mull     | mesotrophic<br>mull    | mesotrophic<br>mull    | mor moder               |
| pH                        | 6.5                     | 4.6                     | 4.8                    | 4.4                    | 3.8                     |

<sup>a</sup> data from the closest meteorology station: Chaumont (05°39'03"E. 48°08'47"N)

<sup>b</sup> data from the closest meteorology station: Amance (6°20'25"E. 48°44'25"N)

<sup>c</sup> data from the closest meteorology station: Vittel (5°57'01"E. 48°12'09"N)

<sup>d</sup> data from the closest meteorology station: La Bresse (6°52'36"E. 48°00'24"N)

<sup>e</sup> data from the closest meteorology station: Epinal (06°27'09"E. 48°10'28"N)

physiological activity of single ectomycorrhizal tips. This allowed us to compare the [ $^{14}\text{C}$ ] glucose catabolism of single ectomycorrhizas of the black *C. geophilum* morphotype and another dominant morphotype (*Lactarius*-type) sampled in five different beech stands in northeastern France. The sites have been selected for their contrasting climatic and edaphic conditions. We evaluated the effect of soil factors, such as soil water potential and soil temperature, on the physiological status of beech ectomycorrhizal roots.

## Materials and methods

### *Experimental stands and sampling patterns*

Investigations were performed on mycorrhizal roots of 80-100 year-old mature beech (*Fagus silvatica* L.) managed as regular high-forest in northeastern France. Five experimental stands (about 1000 m<sup>2</sup> each) were chosen along a 250 km transect of increasing rainfall and contrasted edaphic conditions (Table III-1). These sites have previously been used to assess the genetic structure of *C. geophilum* populations (Jany *et al.*, 2002). Each stand contained five 15 m<sup>2</sup> randomly localized plots (3 x 5 m) equipped with a micropsychrometer probe PST-55-15-SF (Wescor, Ut, USA) set horizontally 5-10 cm deep in the A<sub>1</sub> horizon. Roots were sampled during two complete growing seasons according to the time-pattern shown in Table III-2. One stand was visited at each sampling date, and soil cores were taken from the inorganic soil layer in the A<sub>1</sub> horizon (about 10 cm deep) in each of the five instrumented plots. At the same time, soil water potential and temperature were measured in each plot by connecting the micropsychrometric probe to a H33-T Dew Point microvoltmeter (Wescor). Soil samples were placed in separate plastic bags, transported on ice and processed immediately after arrival at the laboratory, i.e. three hours at most after harvest.

### *Ectomycorrhiza preparation*

Samples were soaked in water for 30 min, and live root tips were then extracted by wet sieving using a combination of 1.0 mm and 500 µm sieves. Root tips were examined under a stereomicroscope and *C. geophilum* ectomycorrhizas and *Lactarius*-type ectomycorrhizas were identified, using macroscopic and microscopic features (Ingleby, 1990; Agerer, 1995). Two *C. geophilum* ectomycorrhizas and two *Lactarius*-type ectomycorrhizas were harvested for each sampled core and immediately processed.

### *C. geophilum* isolates

Three *C. geophilum* isolates originating from the studied beech stands (Am5.1 from Amance, Cre4.1 from La Crête, And Td3.1 from Tendon), one *C. geophilum* isolated from Sweden (147-54, CentraalBureau voor Schimmelcultures, The Netherlands) and one *Lactarius subdulcis* isolated from France (Menez, 1983) were maintained in culture plates on MEA2% (malt extract agar 2%) media covered with washed, autoclaved cellophane disks. These mycelial cultures were grown at 25°C and used to test *C. geophilum* for its potential respiration activity when it was exposed to *in vitro* drought stress conditions, induced as follows.

### Drought stress induction on *C. geophilum* isolates

Saturated salt solutions of  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  were added in a compartment of a two-compartment petri dish, in order to create 31% relative humidity (RH) and 51% RH conditions, respectively. Disks of mycelium mat (7-mm diameter disks cut from the edge of 8-week-old colonies) of the four *C. geophilum* isolates maintained in pure culture (see above) were set in the salt-free compartment of the Petri dish, and the sealed dish was incubated at 25°C for 1 h, 2 h or 4 h. A control treatment, for which the mycelial disk was not set in low RH conditions, was added. For each treatment (except for 31% HR treatment for which we tested only isolates 147-54 and Cre41), four mycelial disks of the four isolates were assayed.

### Microradiorespirometry assay

Each single ectomycorrhiza or mycelial disk was introduced in a rubber-stopped 10 ml Erlenmeyer flask equipped with a side-arm and a hanging polypropylene center well (Kimble-Kontes, NJ, USA), and incubated overnight (15 h) at 25°C, on an orbital shaker (150 rpm), in 1 ml of modified Pachlewski sterile medium (Pachlewski and Pachlewska, 1974) containing 1.6 mM  $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{glucose}$  (0.5  $\mu\text{Ci}$ ). Antibiotics were not added to the incubation medium since tests comparing radiorespirometry assay using rifampicin and/or chloramphenicol did not show difference with assays without any antibiotics added to the incubation medium. The respired  $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  was trapped in the center well of the flask that contained 100  $\mu\text{l}$  of Kombutron, a  $\text{CO}_2$ -trapping scintillation fluid (Kontron Analytic, Zurich, Switzerland). After incubation, 200  $\mu\text{l}$  of trichloroacetic acid were added through the rubber stop of the the side-arm using a syringe, in order to release residual  $\text{CO}_2$  possibly dissolved in the incubation medium. The 100  $\mu\text{l}$  of the  $\text{CO}_2$ -trapping scintillation fluid were added to 5 ml of Ecolite scintillation liquid (ICN

**Table III-2.** Soil temperature and water potential for the 1999 and 2000 growing seasons.

| Stands   | Date           | Soil temperature<br>(°C)* | Water soil potential<br>(MPa)* |
|----------|----------------|---------------------------|--------------------------------|
| La Crête | Jul 1 -1999    | 14                        | -0.20                          |
|          | Oct 14 - 1999  | 11.5                      | -0.20                          |
|          | Jun 14 - 2000  | 16                        | -0.19                          |
|          | Jul 19 - 2000  | 13.5                      | -0.13                          |
|          | Aug 23 - 2000  | 14                        | -0.63                          |
|          | Sep 27 - 2000  | 13                        | -0.19                          |
| Amance   | Jul 8 - 1999   | 14.5                      | -0.13                          |
|          | Aug 3 -1999    | 15.5                      | -0.62                          |
|          | Oct 21 - 1999  | 8.5                       | -0.39                          |
|          | May 31 - 2000  | 11                        | -0.12                          |
|          | Jun 20 - 2000  | 16.5                      | -0.57                          |
|          | Aug 9 - 2000   | 15                        | -0.32                          |
|          | Sep 13 - 2000  | 16                        | -0.72                          |
| Charmois | May 20 -1999   | 9.5                       | -0.20                          |
|          | Jul 15 - 1999  | 16                        | -0.11                          |
|          | Aug 8 - 1999   | 13.5                      | -0.14                          |
|          | Oct 7 - 1999   | 14                        | -0.14                          |
|          | Jun 7 - 2000   | 13                        | -0.20                          |
|          | Jul 12 - 2000  | 12.5                      | -0.20                          |
|          | Aug 17 - 2000  | 17                        | -0.24                          |
|          | Sep 20 - 2000  | 13                        | -0.14                          |
| Hennezel | Jun 17 - 1999  | 14.5                      | -0.18                          |
|          | Jul 21 - 1999  | 16                        | -0.14                          |
|          | Aug 26 - 1999  | 16.5                      | -0.56                          |
|          | Jun 24 - 2000  | 10.5                      | -0.20                          |
|          | Jul 5 - 2000   | 14                        | -0.40                          |
|          | Aug 2 - 2000   | 16                        | -0.13                          |
|          | Sep 6 - 2000   | 16                        | -0.66                          |
| Tendon   | Jun 10 - 1999  | 11                        | -0.26                          |
|          | Jul 29 - 1999  | 16.5                      | -0.54                          |
|          | Sep 2 - 1999   | 15.5                      | -0.55                          |
|          | Oct 27 - 1999  | 11                        | -0.16                          |
|          | May 17 - 2000  | 13                        | -0.19                          |
|          | June 28 - 2000 | 12.5                      | -0.49                          |
|          | July 26 - 2000 | 14                        | -0.18                          |
|          | Aug 30 - 2000  | 14.5                      | -0.15                          |

\* Mean values averaged from five measures among the plot.

Pharmaceuticals, Ca, USA) and counted directly in a 1900-CA TriCarb liquid scintillation analyser (Packard Instrument Company, IL, USA). Mycelial disks were dried at 35°C for 12 h and their dry mass was measured, whereas ectomycorrhizas were assayed for ergosterol content.

#### *Determination of ergosterol content by HPLC*

Extraction of ergosterol was done as described by Martin *et al.* (1990). Ergosterol, a specific component of fungal membrane (Weete, 1974), reflects the live fungal biomass (Martin *et al.*, 1990; Nylund and Wallander, 1992). Considering that the variable component in the compared beech ectomycorrhiza was the fungal partner, we expressed the potential respiration activity (PRA) values per picogram of ergosterol content in the whole ectomycorrhiza. For equivalent weight, *C. geophilum* (isolate 147-54) was found to contain 1.5 fold more ergosterol than *L. subdulcis* (isolate BRI 2). PRA of *C. geophilum* ectomycorrhizas could be underrated when comparing *C. geophilum* and *Lactarius*-type.

#### *Data analysis*

Potential respiration activities of single ectomycorrhizas (PRA) were expressed in CPM (count per minute) per pg of ergosterol. The non parametric and paired Wilcoxon signed-rank test, which makes no assumptions about the distribution of the data, was used to test the hypothesis that there was a difference between PRA of *C. geophilum* and *Lactarius*-type ectomycorrhizas. Differences could be tested when the number of paired data (n) was  $\geq 6$ .

## **Results**

#### *Soil parameters*

Investigations carried out on five beech stands during two complete growing seasons (2000 and 2001) addressed a wide range of edaphic (sandy granite to clayey limestone) and climatic (annual rainfall from 800 mm to 2500 mm) conditions. Temperature and water potential of the A<sub>1</sub> soil horizon were variable throughout the growing seasons (Table III-2). Soil temperatures ranged between 9 °C and 17 °C, whereas soil water potential ranged from -0.05 to -0.9 MPa. Most soil water potential values were in the higher potentials ( $\geq -0.2$  Mpa), and values lower than -0.8 MPa were measured only four times throughout our study. The lowest soil water potentials were

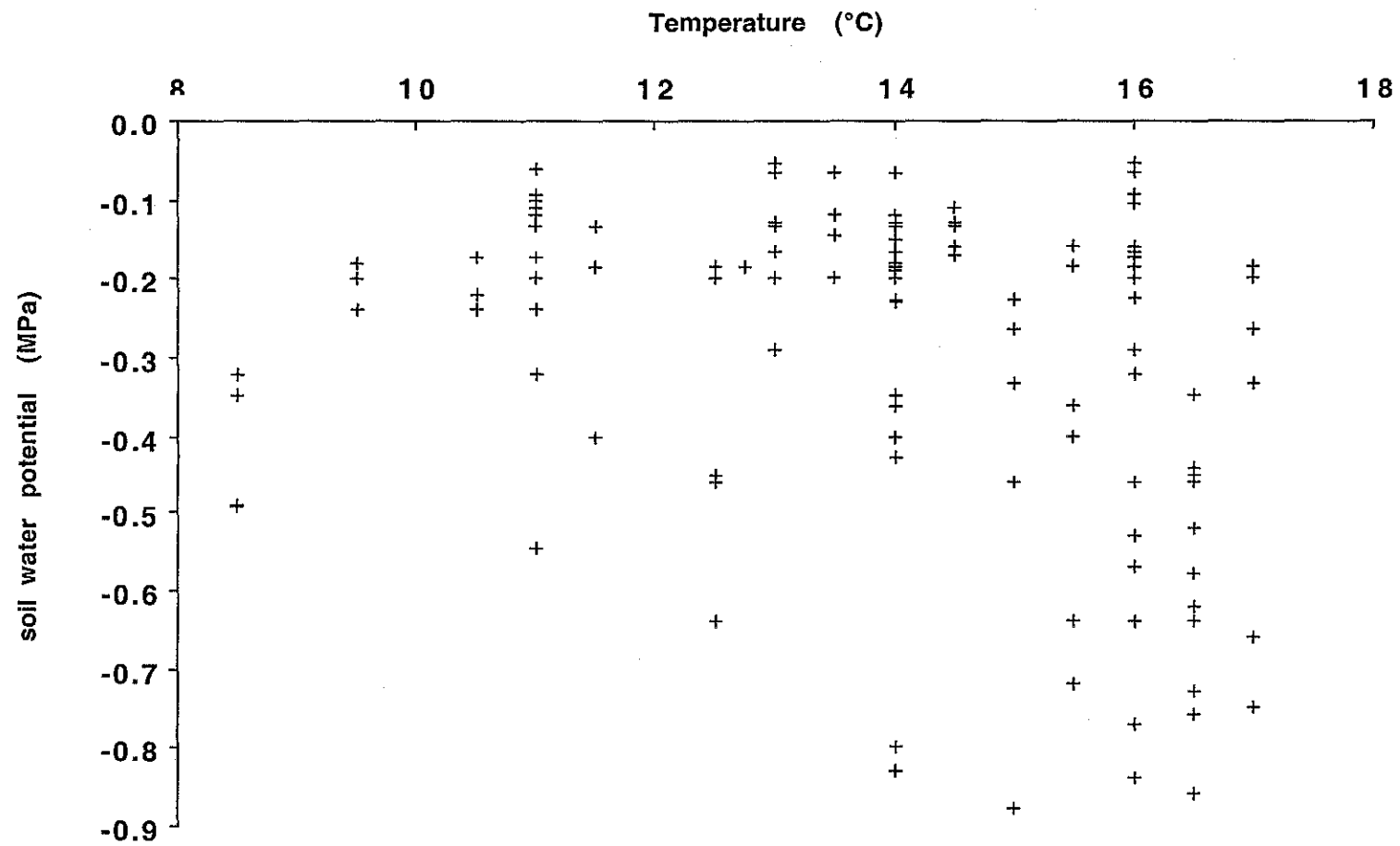


Figure III-1. Relation between soil water potential in MPa and soil temperature in °C for each sample tested.

recorded when the soil temperatures were the highest but high soil water potentials ( $\geq -0.2$  Mpa) were also observed in the range of high temperatures (Fig. III-1).

#### *Ectomycorrhizal types*

The *Lactarius*-type, with smooth, branched and yellowish ectomycorrhizas was dominant in the five beech stands. The *C. geophilum* morphotype with thick, straight, unbranched and dark hyphae emanating from a black ectomycorrhizal mantle represented 10% to 40% of all root tips depending on the sampling date. In the five beech stands, a minimum estimates of five *C. geophilum* genotypes were found to form ectomycorrhizas (Jany *et al.*, 2002).

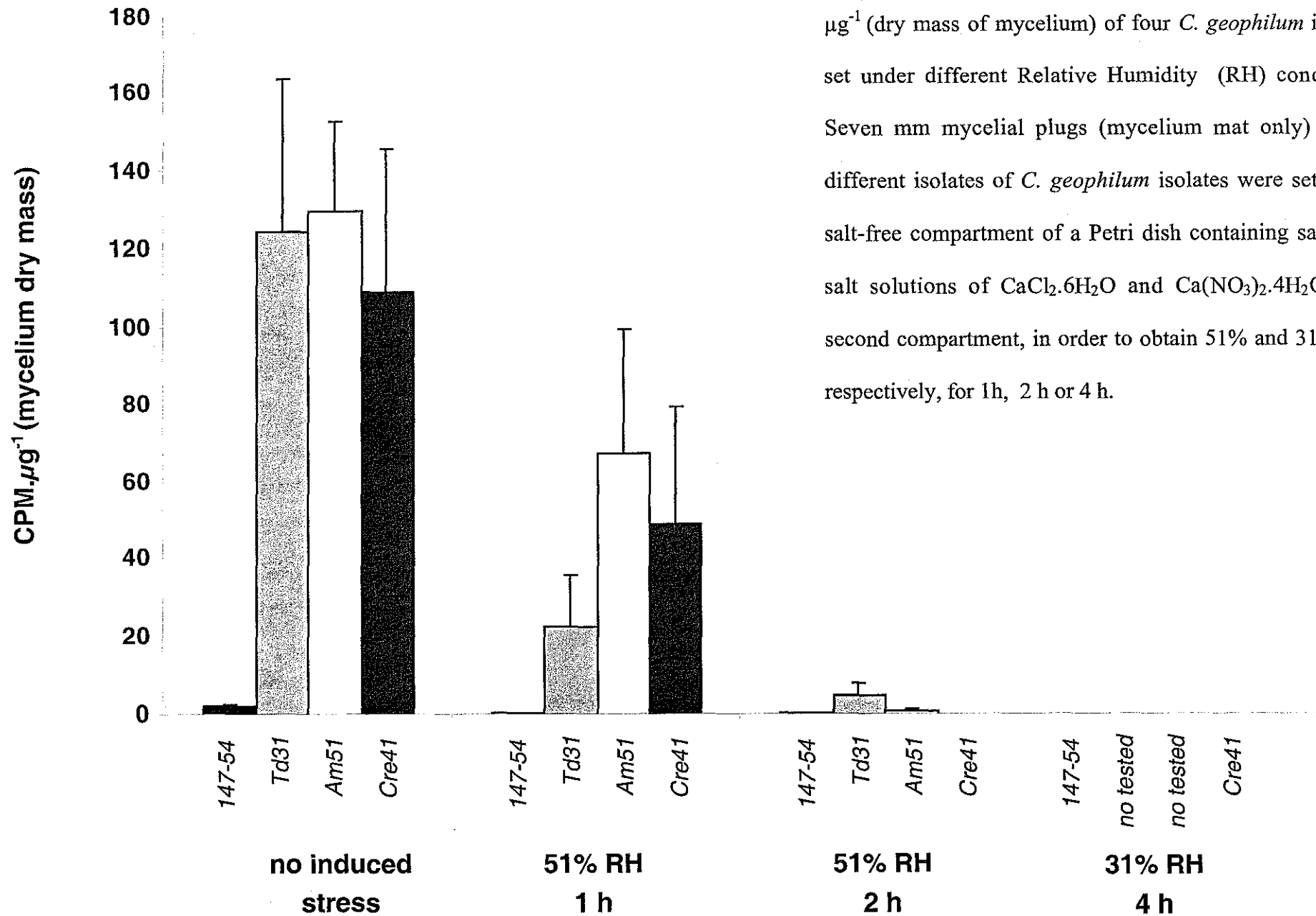
#### *Potential respiration activity (PRA) of C.geophilum under in vitro drought stress conditions*

For each treatment, *PRA* of the *C. geophilum* isolates (Td3.1, Am5.1 and Cre4.1) originating from sclerotia harvested in northeastern France was higher than *PRA* of the swedish *C. geophilum* isolate 147-54. *PRA* of the four *C. geophilum* isolates of different genotypes (Jany *et al.*, 2002) was strikingly reduced when the mycelium was previously submitted to *in vitro* drought stress (Fig. III-2). Decreasing RH and increasing duration of the drought stress resulted in reduced *PRA* values. Incubation of mycélium for 4 h at 51% RH led to undetectable *PRA*

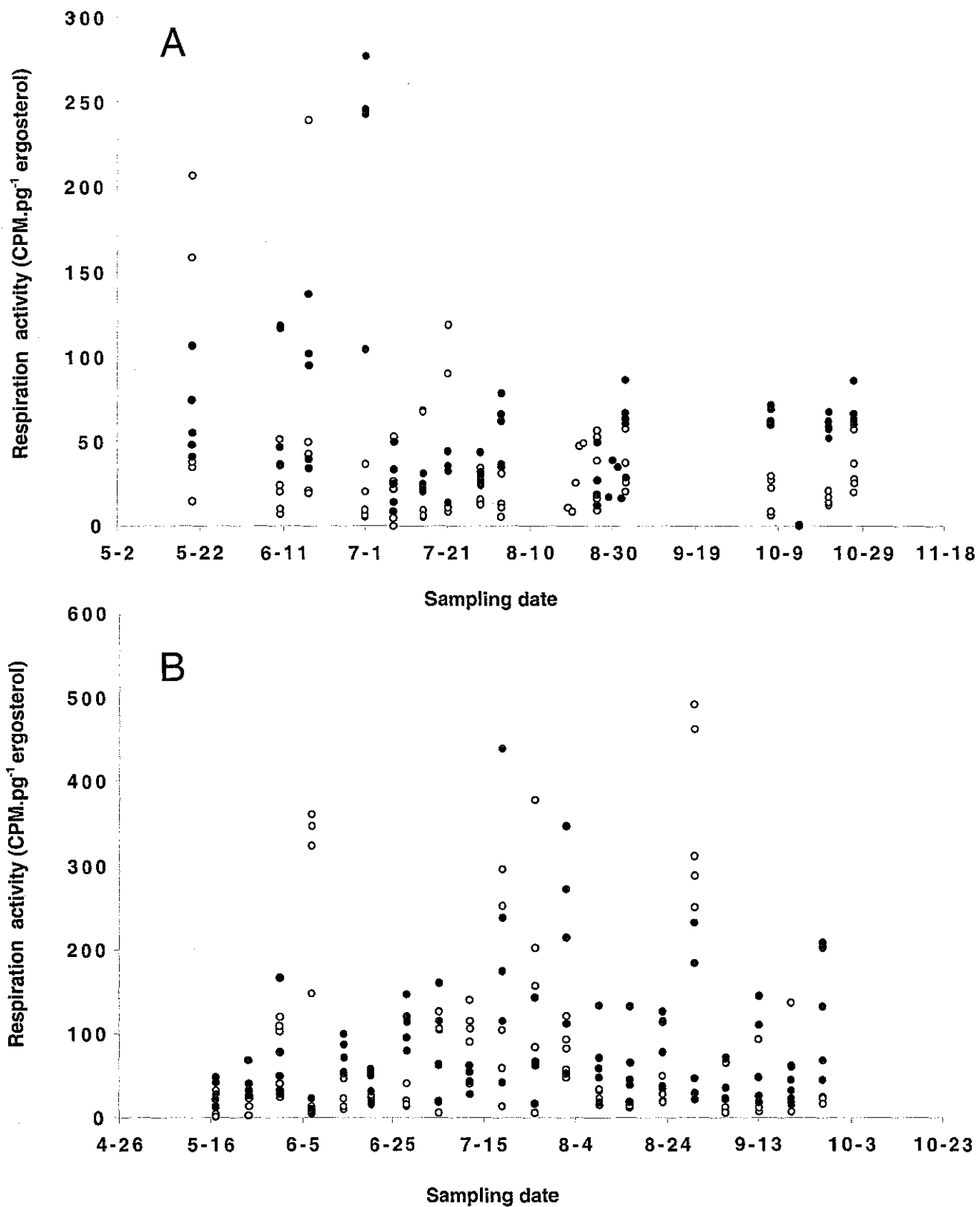
#### *Potential respiration activity (PRA) of ectomycorrhizas*

*PRA* of *C. geophilum* and *Lactarius*-type ectomycorrhizas was highly variable throughout the two growing seasons ranging from zero up to 500 CPM.pg<sup>-1</sup> ergosterol. *PRA* was not related with the sampling date (Fig. III-3), but was correlated to other factors such as soil water potential and temperature. *PRA* values in relation with soil water potential and soil temperature (Fig. III-3) were highly variable and their distribution was asymmetric, with 80 % of data lower than 100 CPM.pg<sup>-1</sup> ergosterol.

We identified six distinct conditions for which the difference between *PRA* of the two ectomycorrhizal types was found to be the most significant using Wilcoxon signed-rank test (Table III-3; Fig. III-4) No differences were found between *PRA* of *C. geophilum* ectomycorrhizas and *Lactarius*-type ectomycorrhizas for conditions 1 ([0; -0.2 MPa]; [8; 13 °C]), 2 ([0; -0.2 MPa]; [13; 14.5 °C]) and 3 ([0; -0.2 MPa]; [14.5; 17 °C]) ( $P > 0.05$ ), whereas *PRA* of *C. geophilum* ectomycorrhizas were higher than *PRA* of *Lactarius*-type ectomycorrhizas for



**Figure III-2.** Potential Respiration Activity (PRA) in CPM.  $\mu\text{g}^{-1}$  (dry mass of mycelium) of four *C. geophilum* isolates set under different Relative Humidity (RH) conditions. Seven mm mycelial plugs (mycelium mat only) of the different isolates of *C. geophilum* isolates were set in the salt-free compartment of a Petri dish containing saturated salt solutions of  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  in a second compartment, in order to obtain 51% and 31% RH, respectively, for 1h, 2 h or 4 h.



**Figure III-3.** Potential Respiration Activity in CPM per pg (ergosterol) of single ectomycorrhizal tips of *C. geophilum* (●) or *Lactarius* sp. (○) sampled during the 1999 (A) and 2000 (B) growing seasons. PRA of five mycorrhizas of each type were measured at each sampling time.

conditions 4 ([-0.2; -0.9 MPa]; [8; 13 °C]) ( $P < 0.01$ ), 5 ([-0.2; -0.9 MPa]; [13; 14.5 °C]) ( $P < 0.05$ ) and 6 ([-0.2; -0.9 MPa]; [14.5; 17 °C]) ( $P < 0.01$ ) (Table III-3).

The difference observed between *C. geophilum* and *Lactarius*-type ectomycorrhizas differ among the five stands (Table III-4). *PRA* was found to be higher for *C. geophilum* than for *L. subdulcis* only for ectomycorrhizas originating from La Crête and Amance stands, but there was no significant difference between *C. geophilum* and *Lactarius*-type for ectomycorrhizas originating from the Charmois, Hennezel and Tendon stands. In addition to the hypothetical effect of the stand origin, genotype-dependant response of *C. geophilum* ectomycorrhizas could be considered: two nuclear rDNA ITS ribotypes ( $A_c$  and  $B_c$ ) were distinguished among these five beech stands, and ribotype  $B_c$  was dominant in the La Crête and Amance stands whereas ribotype  $A_c$  was detected in the Charmois stand and very dominant in Hennezel and Tendon stands (Jany *et al.*, 2002).

## Discussion

In the current study, we have assessed glucose respiration of single ectomycorrhizal tips to compare the physiological activity of *C. geophilum* and *Lactarius*-type ectomycorrhizas in beech stands exhibiting contrasting edaphic conditions.

The metabolic activity of spruce ectomycorrhizas has been assessed *in situ* by monitoring trehalose synthesis (Niederer *et al.*, 1989). These authors found a strong correlation between the rate of trehalose synthesis in ectomycorrhizas and their integrity as assessed by visual estimation. However this method is irrelevant when comparing different ectomycorrhizal types since carbohydrate synthesis and storage differ between ectomycorrhizal fungi (Martin *et al.*, 1984a; b; 1985; 1988; Koide *et al.* 2000). In addition, fungus-specific sugar synthesis does not give any information on the functional status of the root and therefore does not address the question of the preservation of physiological functions of the whole symbiotic organ by the fungal partner. In contrast when glucose oxidation is measured rapidly after ectomycorrhiza sampling, it can provide information about metabolic activity of the whole ectomycorrhiza (Hacskeylo *et al.*, 1965; Garrett *et al.*, 1982; Marshall and Perry, 1987; Al Abras *et al.*, 1988). Glucose respiration makes possible to compare different ectomycorrhizal species, because glucose is known to be delivered in the apoplast by hydrolysis of sucrose originating from the plant partner (Nehls *et al.*, 2001) and it can be metabolised by the fungal symbiont as well as by the plant.

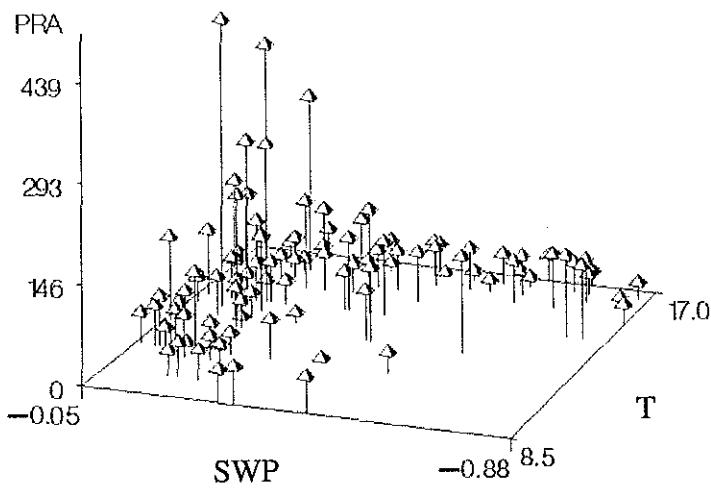
**Table III-3.** Difference of PRA between *C. geophilum* (*Cg*) and *Lactarius* type (*Lt*) ectomycorrhizas among different soil water potential and soil temperature ranges.

| Soil conditions # <sup>a</sup> | soil water potential | soil temperature | PRA of <i>Cg</i> vs PRA of <i>Lt</i>          |
|--------------------------------|----------------------|------------------|-----------------------------------------------|
| 1                              | [0; -0.2] MPa        | [8; 13[ °C       | n.s. (P > 0.05) <sup>b</sup>                  |
| 2                              | [0; -0.2] MPa        | [13; 14.5] °C    | n.s. (P > 0.05) <sup>b</sup>                  |
| 3                              | [0; -0.2] MPa        | ]14.5; 17] °C    | n.s. (P > 0.05) <sup>b</sup>                  |
| 4                              | ] -0.2; -0.9] MPa    | [8; 13[ °C       | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> (P < 0.01) <sup>b</sup> |
| 5                              | ] -0.2; -0.9] MPa    | [13; 14.5] °C    | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> (P < 0.05) <sup>b</sup> |
| 6                              | ] -0.2; -0.9] MPa    | ]14.5; 17] °C    | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> (P < 0.01) <sup>b</sup> |
| overall range                  | [0; -0.9] MPa        | [8; 17] °C       | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> (P < 0.01) <sup>b</sup> |

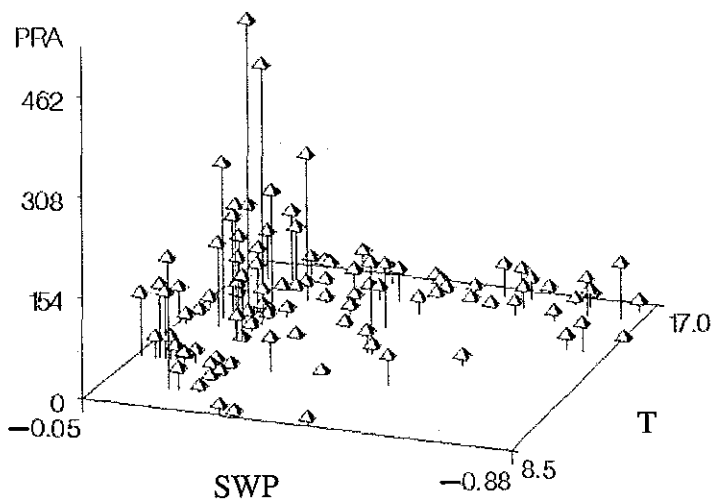
<sup>a</sup> See also Fig. 4(B)

<sup>b</sup> Wilcoxon signed rank test

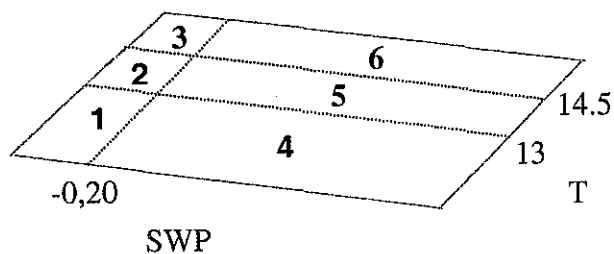
(A) *C. geophilum* type



(B) *Lactarius* type



(C)



**Figure III-4.** Distribution of respiration activities (*PRA*) in CPM per pg (ergosterol) of single *C. geophilum* (A) or *Lactarius*-type (B) ectomycorrhizal tips, in relation with the soil water potential (SWP) in MPa and the temperature (T) in °C. Each ectomycorrhiza was sampled from *in situ* conditions. Respiration activities were assessed using a micro-radiorespirometry method and soil water potential and soil temperature were measured for each sample using field micropsychrometers. Six distinct soil conditions (1 to 6) for which the difference between *PRA* of *C. geophilum* and *Lactarius*-type ectomycorrhizas was empirically found to be the most significant (see also Table 3) are represented in (C).

**Table III-4.** Difference of PRA between *C. geophilum* (*Cg*) and *Lactarius* type (*Lt*) ectomycorrhizas for different soil water potential and temperature ranges among the five sampling stand and for the overall sampling.

| Soil water potential           | Soil temperature | La Crête<br>(B <sub>c</sub> ) <sup>a</sup> | Amance<br>(B <sub>c</sub> ) <sup>a</sup> | Charmois<br>(A <sub>c</sub> ) <sup>a</sup> | Hennezel<br>(A <sub>c</sub> ) <sup>a</sup> | Tendon<br>(A <sub>c</sub> ) <sup>a</sup> | Overall<br>sampling                |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| [0;- 0.2] MPa                  | [8; 13[ °C       | - <sup>e</sup>                             | - <sup>e</sup>                           | <i>Lt</i> > <i>Cg</i> <sup>d</sup>         | - <sup>e</sup>                             | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup>       | n.s. <sup>b</sup>                  |
| [0; -0.2] MPa                  | [13; 14.5] °C    | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>b</sup>         | - <sup>e</sup>                           | n.s. <sup>b</sup>                          | - <sup>e</sup>                             | <i>Lt</i> > <i>Cg</i> <sup>c</sup>       | n.s. <sup>b</sup>                  |
| [0; -0.2] MPa                  | ]14.5; 17] °C    | - <sup>e</sup>                             | - <sup>e</sup>                           | n.s. <sup>b</sup>                          | n.s. <sup>b</sup>                          | - <sup>e</sup>                           | n.s. <sup>b</sup>                  |
| ] -0.2; -0.9] MPa              | [8; 13[ °C       | - <sup>e</sup>                             | - <sup>e</sup>                           | - <sup>e</sup>                             | - <sup>e</sup>                             | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>d</sup>       | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup> |
| ] -0.2; -0.9] MPa              | [13; 14.5] °C    | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup>         | - <sup>e</sup>                           | - <sup>e</sup>                             | - <sup>e</sup>                             | - <sup>e</sup>                           | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>d</sup> |
| ] -0.2; -0.9] MPa              | ]14.5; 17] °C    | - <sup>e</sup>                             | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup>       | - <sup>e</sup>                             | n.s. <sup>b</sup>                          | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup>       | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup> |
| [0; -0.9] MPa<br>overall range | [8; 17] °C       | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup>         | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup>       | n.s. <sup>b</sup>                          | n.s. <sup>b</sup>                          | n.s. <sup>b</sup>                        | <i>Cg</i> > <i>Lt</i> <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> dominant ribotype

<sup>b</sup> non significant with  $P > 0.05$ , Wilcoxon signed rank test

<sup>c</sup>  $P < 0.01$ , Wilcoxon signed rank test

<sup>d</sup>  $P < 0.05$ , Wilcoxon signed rank test

<sup>e</sup> number of paired data (PRA of *Cg* ectomycorrhiza and PRA of *Lt* ectomycorrhiza) < 6

The mycelium of *C. geophilum* exhibited a reduced glucose respiration activity when exposed to drought stress: the stronger the induced stress (Fig. III-2); the lower the respiration activity. This means that the reduction of the respiration activity reveals stress-altered physiological abilities of the fungus, suggesting that glucose respiration is a reliable indicator of vitality that makes possible comparisons between ectomycorrhizas.

The lack of a normal distribution of *PRA* values when plotted against soil water potential and soil temperature also suggests that many factors (e.g., host tree photosynthetic activity, nutrient availability...) other than those monitored here (soil temperature and soil water potential) can alter the functional status of ectomycorrhizas. We however assumed that alteration of *PRA* by drought plays an important role in this limitation as shown by the reduced *PRA* values for soil water potential < -0.2 MPa (Fig. III-4). The present study showed that functional integrity of ectomycorrhizas (as assessed by measuring *PRA*) was significantly less altered by moderately low soil water potentials for *C. geophilum* ectomycorrhizas than for the dominant *Lactarius*-type ectomycorrhizas for soil water potential < -0.2 MPa. This result supports the hypothesis of the better resilience to drought of *C. geophilum* comparatively to other ectomycorrhizal fungi (Mexal & Reid, 1973; Theodorou, 1978). *C. geophilum* would provide an adaptive advantage to the colonised root because it preserves an intact absorptive system for longer periods of time, allowing the uptake of water and ions to resume immediately in favourable post-drought periods, whereas dead ectomycorrhizas involving other fungi have to be replaced by new ones (Pigott, 1982a,b). Whether water storage in the thick melanin-rich cell walls or accumulation of osmolytes are involved in *C. geophilum* resilience to drought stress remain to be determined.

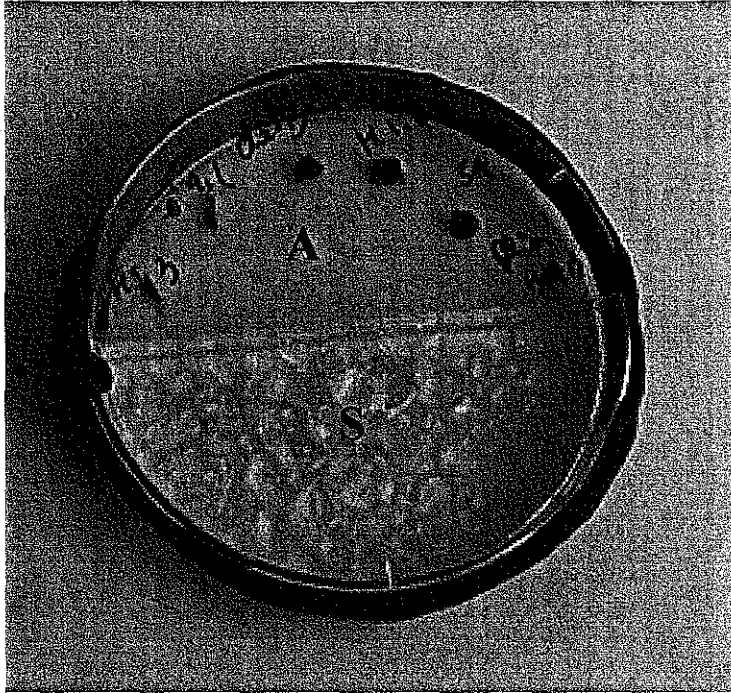
The difference in *PRA* observed between *C. geophilum* and *Lactarius*-type ectomycorrhizas differed among the five beech stands (Table III-4, A to F). *PRA* were found to be higher for *C. geophilum* than for *Lactarius* sp. only for ectomycorrhizas originating from La Crête and Amance stands. There was no significant difference between *C. geophilum* and *Lactarius*-type for ectomycorrhizas originating from the Charmois, Hennezel and Tendon beech stands. Such differences between stands may be related to stand features and/or to genotypic intraspecific variation. Interestingly, we have shown in a previous work that populations of *C. geophilum* colonizing beech fine roots differ genetically between these five stands (Jany *et al.*, 2002). Although variability in the difference of *PRA* between *C. geophilum* and *Lactarius* sp. among the different beech stands can emanate also from variations in the response of the poorly

defined *Lactarius*-type, it is likely that, at the regional scale, local *C. geophilum* populations differ in their ability to alleviate the effects of drought on beach roots.

## **Acknowledgments**

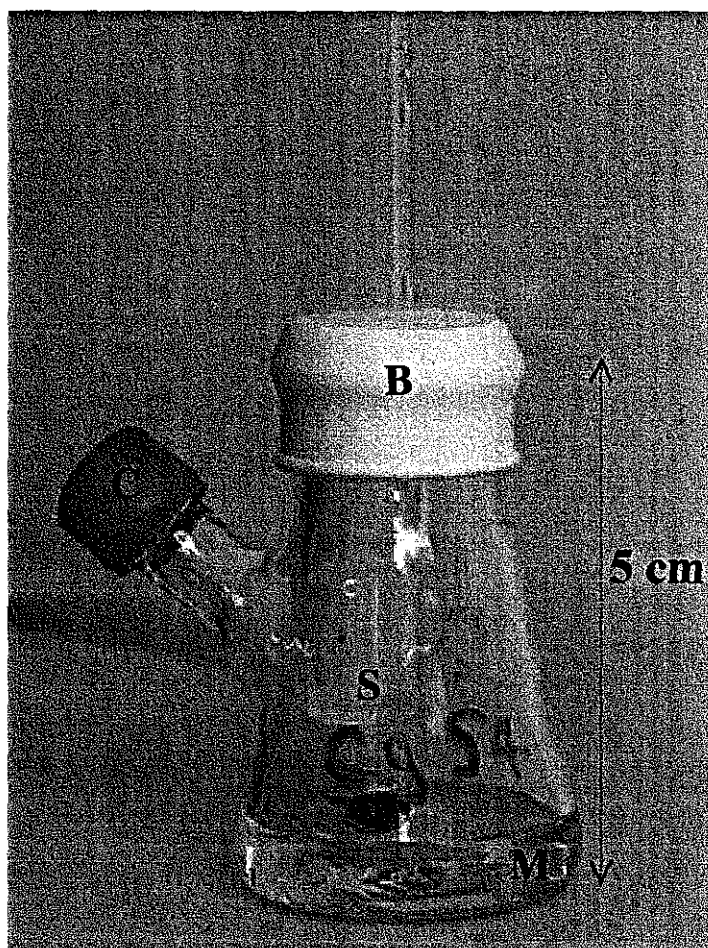
This study was part of JL Jany's PhD. project funded by a scholarship from the Office National des Forêts (O.N.F.) and the Région Lorraine. We thank J.L. Churin and P. Vion for their assistance in the field surveys, F. Colin for assistance in preparing Fig. III-4. and M. Buée for stimulating discussions.

## Annexe III-1



Photographie du système expérimental permettant l'induction des stress hydriques en atmosphère 31% HR (humidité relative) ou 51% HR. Les disques mycéliens sont placés dans le premier compartiment (A) d'une boîte de Petri bi-compartimentée, tandis que qu'une solution saline sursaturée (S) est disposée dans le second compartiment. La boîte est hermétiquement scellée.

## Annexe III-2



Photographie du système expérimental permettant la réalisation du test radiorespirométrique : La fiole en verre (10 ml) hermétiquement fermée à l'aide des deux bouchons en caoutchouc (B et C) contient le milieu (M) contenant du  $[^{14}\text{C}]$ glucose dans lequel est placé l'ectomycorhize ou le disque mycelien dont on souhaite mesurer l'activité respiratoire potentielle. Le liquide de piégeage du  $\text{CO}_2$  est disposé dans une cupule suspendue (S). En fin d'expérience à l'aide d'une seringue on peut injecter via le bras latéral (L) de l'acide triacétique, puis récupérer le liquide de piégeage du  $\text{CO}_2$ .

## Chapitre IV

---

**Etude par résonance magnétique nucléaire du  $^{13}\text{C}$  du  
métabolisme carboné des champignons ectomycorhiziens  
*Cenococcum geophilum* et *Laccaria bicolor* en réponse au  
stress hydrique.**

---

Les figures IV-1 à IV-9, non paginées, sont disposées à la fin de ce chapitre.

## Introduction

Les champignons ectomycorhiziens présentent de grandes différences dans leur capacité à résister au stress hydrique (Mexal et Reid, 1973 ; Coleman *et al.*, 1989 ; Neves Machado, 1995). Parmi les champignons ectomycorhiziens déjà étudiés, les genres *Suillus* (Coleman *et al.*, 1989), *Rhizopogon* (Parke *et al.*, 1983 ; Coleman *et al.*, 1989), et surtout *Cenococcum* (Coleman *et al.*, 1989 ; Neves Machado, 1995) apparaissent comme les mieux adaptés à la sécheresse édaphique. Cette résistance est susceptible de favoriser la survie et la croissance du mycélium végétatif dans un sol lorsque le potentiel hydrique de ce-dernier est abaissé.

Le déterminisme physiologique de cette résistance est peu connu mais Coleman *et al.* (1989) supposent que cette capacité à résister à la sécheresse pourrait émaner de l'aptitude du champignon à réaliser des ajustements osmotiques durant une période de stress. L'existence d'un tel phénomène a déjà été mise en évidence chez des champignons non mycorhiziens xérophiles ; Hocking et Norton (1983) ont montré le rôle prépondérant de l'accumulation de glycérol face à une diminution du potentiel hydrique du milieu.

Dans le sol, le potentiel hydrique interne des hyphes d'un champignon ectomycorhizien s'équilibre avec le potentiel environnant, et comprend deux composantes : le potentiel osmotique, fonction de la concentration en solutés dans la cellule, et le potentiel de turgescence qui s'équilibre avec le potentiel osmotique et répond à la déformation des parois cellulaires. En conditions de faible potentiel hydrique du milieu, l'eau a tendance à quitter les hyphes pour diffuser vers l'extérieur, entraînant une perte de volume et de turgescence ainsi que des perturbations du métabolisme. Ces processus sont responsables d'une altération aux niveaux de la croissance et du fonctionnement général des champignons ectomycorhiziens (Ray *et al.*, 1972). Afin de préserver ces fonctions et donc de survivre, le champignon doit rétablir la turgescence et apporter une protection aux acteurs du métabolisme cellulaire. Ces processus doivent être réalisés à l'aide de solutés compatibles avec le métabolisme du champignon. En cas de stress, ces solutés peuvent être accumulés après influx vers la cellule, décompartmentation ou néosynthèse.

Pour Brown (1990), un soluté compatible est un élément qui, même à forte concentration, n'interdit pas le bon fonctionnement des processus cellulaires essentiels. Les solutés compatibles peuvent donc s'accumuler dans la cellule sans produire de perturbations. Contrairement aux végétaux où la vacuole occupe la majorité du volume cellulaire et accueille 80% de solutés compatibles (Stoop *et al.*, 1996), chez les champignons, celle-ci ne représente en moyenne que

17% du volume cellulaire et c'est dans le cytosol que s'accumulent principalement les solutés compatibles (Jennings et Burke, 1990).

Ces solutés compatibles peuvent avoir plusieurs rôles, ils peuvent : (i) assurer une osmorégulation en agissant comme osmolytes ; (ii) protéger le métabolisme en empêchant la dénaturation des protéines, en particulier en se 'substituant' à l'eau liée et en évitant la formation de liaisons intra- et inter-moléculaires au niveau des groupes polaires ; (iii) constituer des réserves ; (iv) et enfin être impliqués dans des voies métaboliques jouant un rôle important en dissipant l'énergie (*'energy spilling reactions'*) afin de découpler production d'énergie et croissance lorsque cette dernière se trouve affectée par le stress (Jennings et Burke, 1990). Chez les micro-organismes, les solutés compatibles majeurs sont : des ions comme le potassium ou le sodium, des acides aminés comme la proline ou le  $\gamma$ -aminobutyrate, des glucides comme le fructose, le glucose, le saccharose ou le tréhalose et enfin des polyols comme le glycerol (Brown, 1990). Les études portant plus spécifiquement sur les champignons ectomycorhiziens ont révélé essentiellement l'accumulation de tréhalose et de mannitol (Martin *et al.*, 1985 ; Koide *et al.*, 2000).

Une bonne résistance au stress hydrique de la part d'un champignon ectomycorhizien, en permettant son développement en conditions de sécheresse, favoriserait la colonisation des racines courtes de ses hôtes potentiels. Le maintien des capacités physiologiques du mycélium tellurique et du mycélium associé à un hôte végétal au sein de l'ectomycorhize procurerait un avantage à la plante, en améliorant son statut hydrique (Wartinger *et al.*, 1992 ; Unestam & Sun, 1995 ; Morte *et al.*, 2000 ; Nardini *et al.*, 2000 ; Morte *et al.* 2001 ; Muhsin and Zwiazek, 2001). Il s'est avéré en particulier, que pour *C. geophilum* il existerait une bonne corrélation entre la résistance du champignon seul, sous forme de mycélium, et celle des ectomycorhizes qu'il forme (Pigott, 1982 a,b ; Neves Machado, 1995). Les mécanismes physiologiques conférant à *C. geophilum* une capacité d'adaptation particulièrement efficace à la sécheresse pourraient ainsi être garants d'une préservation des structures ectomycorhiziennes.

Nous avons recherché dans le mycélium de *C. geophilum* l'accumulation éventuelle de solutés compatibles organiques susceptibles de maintenir des flux métaboliques normaux et d'expliquer la résistance à la sécheresse de *C. geophilum* et des ectomycorhizes qu'il forme. A cette fin, nous avons analysé et comparé, par RMN du  $^{13}\text{C}$ , le métabolisme carboné et les effets de stress hydriques induits sur la composition en métabolites carbonés des hyphes de *C.*

*geophilum* et de *Laccaria bicolor*, espèce reconnue comme peu tolérante au stress hydrique (Coleman *et al.*, 1989).

## **Matériels et Méthodes**

### ***Matériel fongique***

#### ***Isolat de C. geophilum***

Nous avons retenu l'isolat 147.54 (Centraal Bureau voor Schimmelcultures, The Netherlands) dont la vitesse de croissance sur milieu de Pachlewski P5 (Pachlewski et Pachlewska, 1974) est l'une des plus élevées parmi les isolats de *C. geophilum* disponibles dans la collection de l'U.M.R. IaM. Un séquençage de l'ITS de l'ADN ribosomique nucléaire a permis de vérifier que cet isolat appartenait bien à l'espèce *C. geophilum*.

#### ***Isolat de L. bicolor***

L'isolat S238N du basidiomycète *Laccaria bicolor* a été retenu pour une partie de notre étude visant à comparer le métabolisme de *C. geophilum* avec celui d'un autre champignon ectomycorhizien peu résistant au stress hydrique (Coleman *et al.*, 1989).

### ***Culture en routine des mycelia fongiques***

Toutes les manipulations ont été réalisées en conditions aseptiques. Les cultures des isolats 147.54 et S238N ont été initiées à partir d'implants d'agar de 7 mm de diamètre prélevés dans la frange d'une colonie mycélienne bien développée. Cet implant a été déposé sur un feuillet de cellophane appliqué sur un milieu de Pachlewski P5 solide (2% agar) (Pachlewski et Pachlewska, 1974) disposé dans une boîte de Petri de diamètre 55 mm. Les boîtes de Petri ont été placées à l'obscurité dans une salle climatisée à 25°C.

### ***Application du stress hydrique.***

#### ***Utilisation du PEG***

Le PEG-3350 (Sigma, Saint-Louis, Missouri) a été utilisé afin d'ajuster le potentiel hydrique de milieux de Pachlewski P5 liquides ou de milieux de Pachlewski liquides modifiés (concentration en glucose abaissée de 110 mM à 5 mM). Le PEG de poids moléculaire inférieur aurait pu être absorbé par le champignon et provoquer des perturbations métaboliques alors que le PEG de

poids moléculaire supérieur aurait risqué de bloquer le passage de l'eau vers les hyphes (Mexal et Reid, 1973). Une gamme de potentiels hydriques décroissants a été obtenue en augmentant la quantité de PEG additionné au milieu. Les potentiels hydriques des milieux ainsi obtenus ont été mesurés en utilisant un osmomètre Wescor C51 (Logan, Utah, USA). Le PEG n'a pas pu être incorporé dans un milieu contenant de l'agar parce qu'il empêche, surtout à forte concentration, la solidification du milieu (Coleman *et al.*, 1989) ; nous avons donc utilisé des milieux de culture liquides. La solution visqueuse de PEG réduit la diffusion de l'oxygène dans les milieux de culture (Mexal *et al.*, 1975) et peut s'avérer toxique ; nous avons choisi de disposer la colonie repiquée ou l'implant de mycélium, en suspens au dessus du milieu (Coleman *et al.*, 1989) : la colonie ou l'implant mycélien ont été repiqués sur un disque de cellophane d'un diamètre légèrement supérieur à celui de la boîte de Petri (55 mm) reposant sur des billes de verre (d'un diamètre de 5 mm) formant une couche unique dans le milieu liquide (12 ml) additionné ou non de PEG à différentes concentrations.

#### *Préparation du système expérimental*

Toutes les cultures en conditions de stress induit ont été réalisées en conditions aseptiques. Les milieux de culture ont été stérilisés par passage à l'autoclave (20 minutes à 120°C). Les disques de cellophane ont été disposés dans une solution d'EDTA (0,37g.l<sup>-1</sup>) chauffée à 100°C pendant 30 minutes, puis autoclavés (20 minutes à 120°C) à deux reprises. Les billes de verre ont été nettoyées : 10 minutes dans du détergent Tween 20 (6 gouttes par litre), 10 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 20%, puis 10 minutes dans une solution d'acide acétique 20% avant d'être abondamment rincées dans de l'eau distillée et séchées dans une étuve à 105°C. Les billes, ainsi nettoyées afin d'éliminer les impuretés pouvant inhiber la croissance du champignon (Neves Machado, 1995), ont été ensuite autoclavées (20 minutes à 120°C) à deux reprises.

*Induction du stress hydrique 'continu' avant analyse en RMN <sup>13</sup>C en abondance naturelle.* Des implant de 7 mm de mycélium de *C. geophilum* 147-54 ont été disposés (voir ci-avant) sur une série de milieux de Pachlewski P5 liquides ([glucose] = 110 mM) additionnés de quantités croissantes de PEG. Nous avons utilisé dans cette expérience des milieux contenant 0% (sans PEG), 5%, 10% et 20% de PEG correspondant à des potentiels hydriques mesurés respectivement

de -0,48 Mpa (sans PEG), -0,55 Mpa, -0,70 Mpa, et finalement -1,25 Mpa. Les implants ont été cultivés sur les différents milieux pendant 7 semaines en salle climatisée à 25°C.

*Induction du stress hydrique transitoire et marquage au  $^{13}\text{C}$  avant analyse en RMN  $^{13}\text{C}$ .* Des implants de 7 mm de mycelium de *C. geophilum* 147-54 ou de *L. bicolor* ont été placés sur milieux gélosés de Pachlewski P5 ([glucose= 110 mM) ne contenant pas de PEG. Après 7 semaines de culture dans ces conditions de croissance optimales les mycéliums ont été transférés sur un milieu liquide frais P5 modifié ne contenant que 20 mM de glucose et sans PEG pendant 48 h, afin d'assurer un approvisionnement optimal en nutriments. Les mycelia ont été par la suite transférés sur des milieux P5 modifiés liquides ne contenant que 5 mM de glucose, fourni sous forme de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose ou de  $[6-^{13}\text{C}]$ glucose et additionnés de 0%, 10%, 20% ou 30% de PEG. Ces milieux possédant alors des potentiels hydriques respectifs de -0,20 MPa (sans PEG), -0,42 MPa, -0,59 MPa et -0,90 MPa. Les mycelia ont été récoltés après 0 h (témoin), 12 h et 36 h de culture.

#### *L'analyse sensu stricto des métabolites carbonés solubles*

##### *Extraction des composés solubles*

Après la période de culture et de traitement, les différents mycelia ont été récoltés, et rincés pendant 30 s dans de l'eau distillée afin d'éliminer le PEG qui aurait pu traverser le disque de cellophane. Après rinçage, les mycelia ont été immédiatement essuyés sur un papier absorbant et plongés dans l'azote liquide afin de stopper toute réaction métabolique, puis conservés à -80°C avant d'être lyophilisés et conservés à température ambiante dans un endroit sec. Les mycelia ont ensuite été broyés à l'aide d'un mortier dans l'azote liquide, et les broyats repris dans 5 ml de méthanol / eau (70/30, v/v) (Martin, 1991). Les homogénats ainsi obtenus ont été disposés pendant 1 h dans de la glace (solubilisation des membranes cellulaires), avant d'être centrifugés à 20.000 g pendant 20 minutes. Les surnageants contenant les composés solubles ont été prélevés et conservés. Les culots ont été homogénéisés puis centrifugés à deux reprises dans du méthanol / eau (70/30, v/v). Enfin, l'ensemble des surnageants (15 ml) ont été filtrés afin d'éliminer les suspensions solides issues de broyage, puis les 12 ml résiduels ont été évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Bioblock Scientific, Illkirch, France). Le produit sec, a été solubilisé dans 1 ml d'une solution aqueuse d'EDTA à 10 mM. Ce dernier permet de chélater les ions

**Tableau IV-1.** Excès isotopiques intramoléculaires du mannitol et du tréhalose détectés par RMN du  $^{13}\text{C}$  dans du mycelium de *Cenococcum geophilum* cultivé 12h ou 36h dans des milieux aux potentiels hydriques décroissants contenant du  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose comme précurseur.

|                        |          | excès isotopique par rapport à l'abondance naturelle |       |           |      |           |      |           |      |
|------------------------|----------|------------------------------------------------------|-------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| composé                | position | -0,20 MPa                                            |       | -0,42 MPa |      | -0,59 MPa |      | -0,90 MPa |      |
|                        |          | 12h                                                  | 36h   | 12h       | 36h  | 12h       | 36h  | 12h       | 36h  |
| mannitol <sup>a</sup>  | C1,6     | 7,6%                                                 | 5%    | 3,1%      | 3,3% | 4,9%      | 2,4% | 2,3%      | 0,8% |
|                        | C3,4     | 0%                                                   | 0%    | 0%        | 0%   | 0%        | 0%   | 0%        | 0%   |
|                        | C2,5     | 0%                                                   | 0%    | 0%        | 0%   | 0%        | 0%   | 0%        | 0%   |
| Tréhalose <sup>a</sup> | C1       | 3,6%                                                 | 1,25% | 0,7%      | 1%   | 0,5%      | 0,5% | 0,5%      | 0,3% |
|                        | C6       | 1,5%                                                 | 0,3%  | 0,3%      | 0,3% | 0,2%      | 0,2% | 0,2%      | 0,1% |
|                        | C2,3,4,5 | 0%                                                   | 0%    | 0%        | 0%   | 0%        | 0%   | 0%        | 0%   |

<sup>a</sup> L'excès isotopique a été calculé par rapport à l'abondance naturelle : abondance isotopique des positions 2 et 5 du tréhalose, non enrichies en  $^{13}\text{C}$ .

paramagnétiques interférant avec l'analyse RMN et sert également de standard interne. Chacune des solutions a été ensuite lyophilisée, puis conservée dans un endroit sec avant l'analyse RMN.

*Spectres RMN  $^{13}\text{C}$ .* Les spectres ont été enregistrés à 100,62 Mhz à l'aide d'un spectromètre Bruker DRX400 (D = 2s ; NS = 16000 ; SW = 236,62 ppm) ou à 75,47 Mhz à l'aide d'un spectromètre Bruker DSX300 (D = 2s ; NS = 16000 ; SW = 315,45 ppm). Les déplacements chimiques ont été exprimés en prenant pour origine le tétraméthylsilane (TMS). Ces analyses ont été réalisées par le Professeur P. Rubini (Laboratoire de chimie physique organique et colloïdale, UHP, Nancy ; U.M.R. CNRS-UHP 7565).

*Calcul des concentrations.* La concentration de chacun des métabolites a été calculée, à partir des analyses de RMN du  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle ; en comparant la hauteur des pics correspondant aux résonances des carbones de chacun des métabolites avec celle des résonances des carbones de l'EDTA dont la concentration est connue.

## Résultats

*Analyse des métabolites carbonés solubles majoritaires détectés par RMN du  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle chez C. geophilum.*

Dans le mycelium végétatif de *C. geophilum*, cultivé sur milieu de Pachlewski modifié (110 mM glucose, 7 mM  $\text{NH}_4^+$ ) (-0,20 MPa) (Fig. IV-1), le mannitol est le composé carboné soluble majoritaire. Sa concentration intracellulaire a été estimée à environ 35 mM (350  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de matière sèche). La concentration en tréhalose, un disaccharide dominant chez de nombreux champignons (Koide *et al.*, 2000) n'est que de 2 mM, alors que le glucose a été détecté à une concentration de 4 mM environ. Parmi les autres résonances dominantes du spectre RMN, nous avons identifié les pics de plusieurs acides aminés : la glutamine et l'acide glutamique (16 mM), l'arginine (15mM) et l'alanine (2mM). En revanche, un carbone, dont le déplacement chimique est approximativement de 45 ppm, n'a pu être identifié.

*Analyse RMN du  $^{13}\text{C}$  des composés carbonés solubles du mycelium de *C. geophilum* lors de l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose en l'absence de stress hydrique induit.*

Le métabolisme de *C. geophilum* a été suivi après apport de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose dans le milieu de culture. Après 12 h de marquage (Fig. IV-2A), le  $^{13}\text{C}$  du glucose est essentiellement incorporé dans le mannitol (46% du  $^{13}\text{C}$  total observable par RMN), le tréhalose (2,5%), la glutamine (10,5%) et l'acide glutamique (6,5%). Le  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose absorbé n'est pas accumulé dans le mycélium indiquant une incorporation rapide.

Au niveau du mannitol, l'excès isotopique  $^{13}\text{C}$  des carbones 1 et 6 par rapport aux carbones 2, 3, 4 et 5 (non enrichis en  $^{13}\text{C}$  par rapport à l'abondance naturelle) est de 7,6% (Tableau IV-1). Cet enrichissement révèle que la néosynthèse de mannitol à partir du glucose est élevée. Cependant cette synthèse ne conduit pas à un accroissement du pool de mannitol : les résonances des carbones 2, 3, 4 et 5 permettent le calcul de la concentration en mannitol qui reste à une valeur de 30 mM comparable à celle calculée avant marquage. Le mannitol synthétisé n'est donc pas stocké mais engagé dans des voies métaboliques ; son taux de renouvellement est élevé.

Concernant le tréhalose, l'excès isotopique  $^{13}\text{C}$  du carbone 1, le plus enrichi, est de 3,6 % (Tableau IV-1), ce qui montre que la majorité du tréhalose est synthétisée directement à partir du glucose. Cependant, le C6 est également enrichi, avec un excès isotopique de 1,5% (Tableau IV-1), ce qui suggère qu'une partie du carbone utilisé pour la synthèse du tréhalose transite par des voies métaboliques permettant une redistribution du  $^{13}\text{C}$  ; c'est à dire un 'passage' du marquage du C1 vers le C6 (ex : via le cycle du mannitol). Les résonances des carbones 2, 3, 4 et 5, qui ne sont pas enrichis, montrent que le tréhalose n'est pas accumulé. Notons que lorsqu'un marquage est effectué pendant 12 h en utilisant du  $[6-^{13}\text{C}]$ glucose au lieu du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose, l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  reste presque aussi élevé au niveau du C1 que du C6 du tréhalose.

Tous les carbones de l'acide glutamique et de la glutamine sont enrichis en  $^{13}\text{C}$  par rapport à l'abondance naturelle estimée à partir du spectre obtenu sans marquage au  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose (Fig. IV-1). Ces acides aminés sont donc synthétisés *de novo* à partir de carbone provenant du catabolisme du glucose. Dans les deux cas, le C4 est celui dont l'excès isotopique est le plus élevé.

Après 36 h de marquage (Fig. IV-2B), le  $^{13}\text{C}$  du glucose est également essentiellement incorporé dans le mannitol (35% du  $^{13}\text{C}$  total observable par RMN), le tréhalose (1,5%), la glutamine (9,5%) et l'acide glutamique (13%). Toutefois, l'abondance isotopique en  $^{13}\text{C}$  de l'ensemble des métabolites détectés par RMN est plus faible qu'à 12 h (Tableau IV-1). Par

exemple, le C1 du mannitol est enrichi à 5%, soit seulement 65 % de sa valeur mesurée à 12 h. Cette baisse du taux d'incorporation indique que la teneur en glucose marqué du milieu de culture chute rapidement et que l'équilibre isotopique des différents *pools* n'est plus respecté.

*Effet d'un stress hydrique induit sur le métabolisme du de [1-<sup>13</sup>C]glucose chez C. geophilum.*

Lors du stress dit continu imposé au mycélium de *C. geophilum* pendant une période de culture de 7 semaines sur un milieu P5 (110 mM de glucose, 7 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), la croissance radiale du mycélium est seulement ralentie par le stress le plus fort (-1,25 MPa). Quelle que soit l'intensité (de -0,48 à -1,25 MPa) de ce stress continu, aucune variation dans la nature et la concentration des métabolites carbonés solubles détectés par RMN du <sup>13</sup>C en abondance naturelle n'a pu être notée (Fig. IV-3). La concentration en mannitol (environ 46 mM) n'a pas varié significativement consécutivement au stress imposé (quelle qu'en soit l'intensité). Nous avons noté une forte concentration (32 mM) en glucose intracellulaire qui n'a pas été modifiée par le stress hydrique induit. La concentration en tréhalose (1,5 mM) est également restée stable. Soumis à un stress continu depuis le stade implant et tout au long d'une croissance de sept semaines, *C. geophilum* n'accumule pas d'osmolytes détectables par RMN du <sup>13</sup>C.

L'application d'un stress hydrique dit transitoire de -0,42 à -0,90 MPa pendant une période de 12 h ou 36 h sur un milieu P5 modifié (5 mM de glucose), ne modifie pas de manière qualitative la composition métabolique du mycélium : aucun osmolyte carboné nouveau n'est détecté. Par contre, dès 12 h, l'enrichissement en <sup>13</sup>C diminue avec l'intensité du stress montrant que l'assimilation de [1-<sup>13</sup>C]glucose est modifiée par l'application du stress.

Après 12 h de marquage (Fig. IV-4), l'analyse des enrichissements isotopiques révèle que le <sup>13</sup>C du glucose est incorporé dans les mêmes composés qu'en l'absence de stress. Par exemple, dans le cas du stress d'intensité intermédiaire correspondant à un potentiel hydrique induit de -0,59 MPa, 37% du <sup>13</sup>C total observable par RMN se retrouve dans le mannitol, 1% dans le tréhalose, 7% dans la glutamine et 8% au niveau de l'acide glutamique.

L'excès isotopique des C1 et C6 du mannitol est plus faible qu'en l'absence de stress (Tableau IV-1). Ces chiffres attestent d'une absorption et d'une assimilation du précurseur marqué qui diminue avec l'intensité du stress.

Concernant le tréhalose, le marquage intramoléculaire montre qu'il y a un excès isotopique détecté pour C1 et C6 mais qui est abaissé avec le stress (Tableau IV-1). Il n'y a pas

**Tableau IV-2.** Excès isotopiques intramoléculaires du tréhalose détectés par RMN du  $^{13}\text{C}$  dans du mycelium de *Laccaria bicolor* cultivé 12h ou 36h dans des milieux aux potentiels hydriques décroissants contenant du  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose comme précurseur.

| composé                | position | excès isotopique par rapport à l'abondance naturelle |      |           |       |           |       |
|------------------------|----------|------------------------------------------------------|------|-----------|-------|-----------|-------|
|                        |          | -0,20 MPa                                            |      | -0,42 MPa |       | -0,59 MPa |       |
|                        |          | 12h                                                  | 36h  | 12h       | 36h   | 12h       | 36h   |
| tréhalose <sup>a</sup> | C1       | 20%                                                  | 23%  | 9,5%      | 12,8% | 8,2%      | 15,8% |
|                        | C6       | 4%                                                   | 4,5% | 1,5%      | 2,2%  | 1,4%      | 2,9%  |
|                        | C3,4     | 1,5%                                                 | 1,7% | 0,5%      | 1,3%  | 0,6%      | 1,4%  |
|                        | C2,5     | 0%                                                   | 0%   | 0%        | 0%    | 0%        | 0%    |

<sup>a</sup> L'excès isotopique a été calculé par rapport à l'abondance naturelle : abondance isotopique des positions 2 et 5 du tréhalose, non enrichies en  $^{13}\text{C}$ .

d'accumulation de tréhalose consécutive au stress, comme attesté par les faibles résonances des carbones non enrichis du tréhalose.

Les carbones C2, C3 et C4 de l'acide glutamique et de la glutamine sont enrichis en  $^{13}\text{C}$  par rapport à l'abondance naturelle, estimée à partir du spectre obtenu en l'absence de marquage au  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Le C4 étant le plus enrichi. L'incorporation de l'isotope dans l'acide glutamique et la glutamine diminuent cependant avec l'intensité du stress. Cette diminution de la synthèse est de 30% dès le premier niveau de stress (-0,42 MPa) pour atteindre près de 50% au niveau le plus élevé (-0,90 MPa).

Après 36 h de marquage (Fig. IV-5), l'abondance isotopique  $^{13}\text{C}$  de l'ensemble des métabolites détectés par RMN est plus faible qu'à 12 h (Tableau IV-1). Comme après 12 h de culture, le stress ralentit l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose.

*Analyse des métabolites carbonés solubles majoritaires détectés par RMN du  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle chez Laccaria bicolor.*

Dans le mycélium de *L. bicolor* cultivé sur milieu de Pachlewski modifié (20 mM glucose, 7 mM  $\text{NH}_4^+$ ) (-0,20 MPa) (Fig. IV-6), le tréhalose est le composé carboné soluble dominant avec une concentration estimée à 28 mM. Aucun pic correspondant au mannitol n'est détecté sur le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  de *L. bicolor*. La concentration intra-hyphale de glucose est estimée à 5 mM. Au niveau des acides aminés, la glutamine (6 mM), ainsi que l'acide glutamique et l'arginine (à faibles concentrations), sont détectés. Deux carbones appartenant à un (des) métabolite(s) abondant(s) (déplacements chimiques approximatifs de 28,5 et 33 ppm), n'ont pu être identifiés.

*Analyse RMN du  $^{13}\text{C}$  des composés carbonés solubles du mycelium de L. bicolor lors de l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose en l'absence de stress hydrique induit.*

Le métabolisme des glucides et des acides aminés de *L. bicolor* a été suivi après apport de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose dans le milieu de culture. Après 12 h de marquage (Fig. IV-7A), le  $^{13}\text{C}$  du glucose est essentiellement incorporé dans le tréhalose (65% du  $^{13}\text{C}$  total observable par RMN) pour les glucides, et au niveau de la glutamine (9%) concernant les acides aminés. Le glucose absorbé n'est pas accumulé dans le mycélium indiquant une incorporation rapide. L'excès isotopique du C1 du tréhalose est de 20% révélant une néosynthèse élevée de tréhalose à partir du glucose (Tableau IV-2). L'excès isotopique du C6 est de 4% et les carbones 3 et 4 apparaissent

également enrichis ( $E\% = 1,5\%$ ). Une synthèse directe du tréhalose (glucose 1- $\alpha$ 1' glucose) à partir du  $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$  conduit à l'accumulation de  $[1,1'-^{13}\text{C}]\text{tréhalose}$  (Martin, 1985). Les enrichissements des différentes positions suggèrent donc que le carbone du glucose emprunte plusieurs voies métaboliques menant à la synthèse de tréhalose. Elles conduisent à une redistribution isotopique du marquage intramoléculaire. D'après les résonances des positions 2 et 5 du tréhalose correspondant à l'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  (1,1%), la concentration en tréhalose est d'environ 21 mM.

Tous les carbones de la glutamine sont enrichis en  $^{13}\text{C}$  par rapport à l'abondance naturelle estimée à partir du spectre obtenu sans marquage au  $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$ . Le C4 est celui dont l'excès isotopique est le plus élevé : 5,7% contre 3,4% et 4% respectivement pour les carbones 2 et 3.

Après 36 h de marquage (Fig. IV-7B), le  $^{13}\text{C}$  du glucose est toujours majoritairement incorporé dans le tréhalose (64% du  $^{13}\text{C}$  total observable par RMN) et dans la glutamine (11,5%) et l'acide glutamique (13%). L'abondance isotopique en  $^{13}\text{C}$  de l'ensemble des métabolites détectés par RMN est supérieure à ce qu'elle était à 12 h (Tableau IV-2). Par exemple, le C1 du tréhalose est enrichi à 23% contre 20% à 12 h; l'excès isotopique du C6 du tréhalose passe de 4 à 4,5% et les carbones 3 et 4 de 1,5 à 1,7%. Globalement au bout de 36 h la concentration en tréhalose a légèrement augmenté par rapport au stade 12 h (25 mM contre 21 mM après 12 h). Au niveau de la glutamine, l'excès isotopique est également augmenté par rapport à 12 h et les différences de marquage intramoléculaire sont toujours en faveur du C4 (excès isotopique de 8,8%) par rapport aux carbones 2 et 3 (excès isotopiques respectifs de 6,8% et 8%).

#### *Effet d'un stress hydrique induit sur le métabolisme du $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$ chez L. bicolor.*

L'application d'un stress hydrique dit transitoire de -0,42 et de -0,59 MPa pendant une période de 12 h ou 36 h sur un milieu P5 modifié (5 mM de glucose), n'a pas induit l'accumulation de métabolites carbonés absents du mycélium non stressé (-0,20 MPa). Les enrichissements en  $^{13}\text{C}$  sont toutefois sensiblement diminués par rapport aux valeurs enregistrées en l'absence de stress montrant que l'absorption de  $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$  par le mycélium de *L. bicolor* est modifiée par l'application du stress.

Après 12 h (Fig. IV-8) ou 36 h (Fig. IV-9) de marquage, l'analyse des enrichissements isotopiques (Tableau IV-2) révèle que le  $^{13}\text{C}$  du glucose est incorporé dans les même composés

qu'en l'absence de stress. Quelle que soit l'intensité du stress (-0,42 ou -0,59 MPa) 75% du  $^{13}\text{C}$  total observable par RMN se retrouve dans le tréhalose, et de 10,2% à 14% dans la glutamine.

L'excès isotopique du C1 et des autres positions du tréhalose diminue avec l'intensité du stress (Tableau IV-2). Toutefois, l'incorporation du  $^{13}\text{C}$  est plus forte après 36 h de marquage (Tableau IV-2).

## Discussion

### *Assimilation du glucose et flux métaboliques chez C. geophilum et L. bicolor.*

Pour les deux champignons testés, les conditions expérimentales retenues ont autorisé l'assimilation du  $[\text{}^{13}\text{C}_1]\text{glucose}$  précurseur, comme l'atteste l'analyse des enrichissements isotopiques au niveau des sucres, mais aussi des acides aminés. L'assimilation du  $[\text{}^{13}\text{C}_1]\text{glucose}$  est rapide car le précurseur ne s'accumule pas dans le mycélium. Toutefois, chez *C. geophilum*, après 36 h de marquage, les enrichissements isotopiques sont plus faibles qu'après 12 h (Tableau IV-1), suggérant que le glucose du milieu est épuisé, et que les sources endogènes de carbone (ex : lipides, sucres de réserve) alimentent la glycolyse et cycle des acides tri-carboxyliques. Ces résultats suggèrent que le flux métabolique dirigé vers la respiration ou vers des synthèses non détectables par RMN du  $^{13}\text{C}$  est beaucoup plus important chez *C. geophilum* que chez *L. bicolor*, conduisant chez *C. geophilum*, à un épuisement rapide du précurseur absorbé.

### *Métabolites carbonés principaux chez C. geophilum et L. bicolor.*

Chez *C. geophilum* (isolat 147-54), l'analyse RMN des composés carbonés solubles accumulés dans le mycélium par quantification du 1,1% de  $^{13}\text{C}$  de l'abondance naturelle (Fig. IV-1) et celle réalisée après marquage au  $[\text{}^{13}\text{C}]\text{glucose}$  (Fig. IV-2) montrent que le mannitol est le métabolite carboné soluble majoritaire (35 mM). Il représente ainsi près de 85% des sucres et pratiquement la moitié de l'ensemble des métabolites détectés par RMN. Cela confirme les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse (GCMS) par Koide *et al.* (2000) qui avaient calculé pour l'isolat A175 de *C. geophilum* que le mannitol représentait 75% des sucres. L'incorporation de  $[\text{}^{13}\text{C}]\text{glucose}$  nous a permis de suivre le devenir du glucose extracellulaire absorbé par le mycélium. Après 12 h de marquage, le mannitol est le métabolite principalement enrichi en  $^{13}\text{C}$ , mettant en évidence une synthèse rapide de mannitol qui ne conduit néanmoins pas à une accumulation de cet hexitol puisque sa concentration intracellulaire

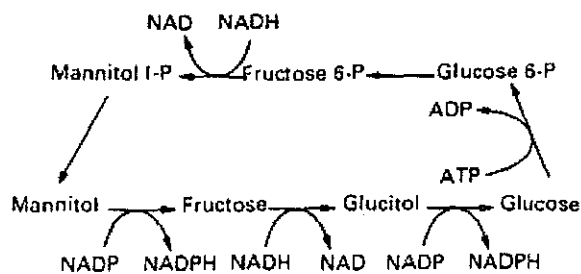


Fig. IV-10 : Le cycle du mannitol, d'après Jennings et Burke (1990)

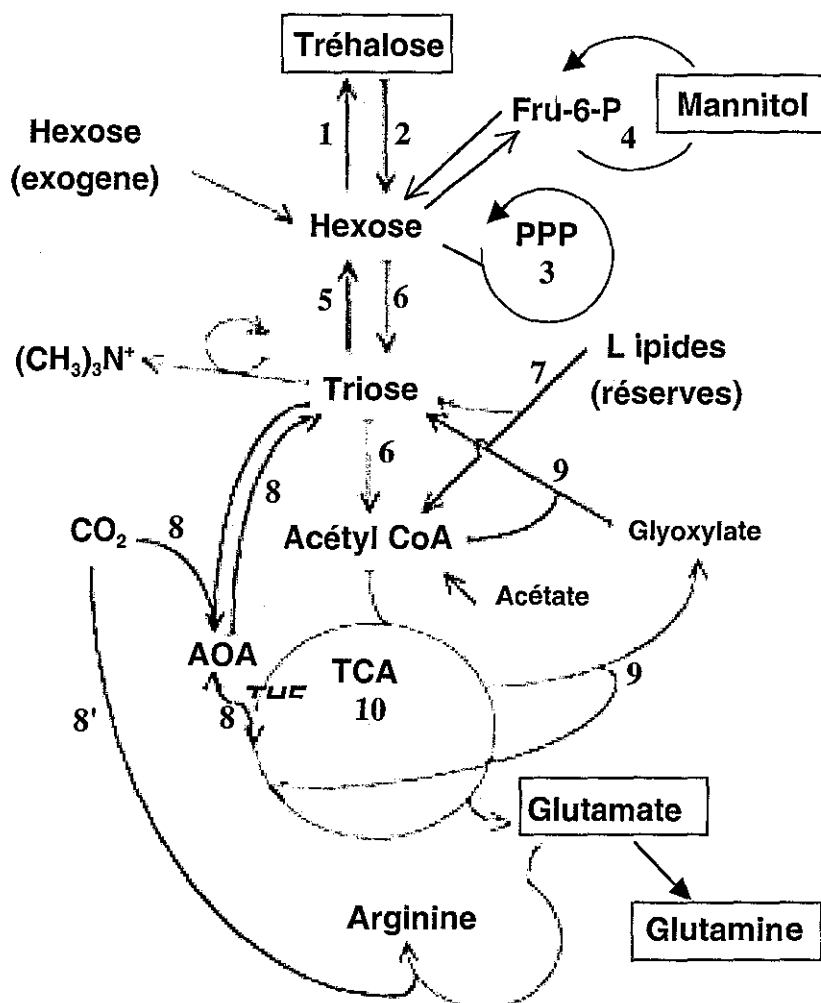


Fig. IV-11 (D'après Bago *et al.*, 1999 ; modifié). Représentation schématique des voies métaboliques. Les produits détectés lors des expériences de RMN du <sup>13</sup>C apparaissent encadrés. (1) synthèse directe de tréhalose à partir du Glc-6-P et d'UDP-Glc ; (2) dégradation du tréhalose par une tréhalase ; (3) cycle des pentoses-P ; (4) cycle du mannitol ; (5) néoglucogenèse, à partir de PEP et impliquant une voie inversée (et modifiée) de la glycolyse ; (6) Glycolyse ; (7) lipolyse dégradation des lipides de réserve (triacylglycérides) en acides gras et glycérol et production d'acétyl CoA par  $\beta$ -oxydation ; (8) fixation de CO<sub>2</sub> par la pyruvate carboxylase pour donner de l'oxaloacétate (AOA) ou (8') : par la carbmoyl synthétase ; (9) cycle du glyoxylate (dérive du cycle des acides tri carboxyliques) qui produit du glyoxylate à partir de l'acétyl CoA, le glyoxylate et l'acétyl CoA donnent un triose et du CO<sub>2</sub> ; (10) Cycle de Krebs (ou cycle des acides tri carboxyliques, TCA).

ne varie pas (35 mM environ). La présence d'une forte concentration en ammonium extracellulaire (7 mM) a stimulé les processus d'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  et a favorisé la synthèse des acides aminés (Fig. IV-1). Ceux-ci représentaient globalement près de la moitié des métabolites carbonés ; l'acide glutamique, la glutamine et l'arginine possédaient des concentrations d'environ 15 mM chacun.

Chez *L. bicolor*, c'est le tréhalose qui est le métabolite carboné dominant (28 mM) et qui représente également environ 85% des sucres analysés (Fig. IV-6). Contrairement à *C. geophilum*, le mannitol n'est pas détecté chez *L. bicolor*. Martin *et al.* (1984) avaient obtenu des résultats similaires chez *Laccaria proxima*. Après marquage au  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose, c'est le tréhalose qui est le plus fortement enrichi (Fig. IV-7), mettant en évidence une synthèse de tréhalose qui ne conduit cependant pas à une accumulation de tréhalose. La concentration en acides aminés est, chez *L. bicolor*, moindre que chez *C. geophilum* (Fig. IV-6). Le principal acide aminé synthétisé et accumulé étant la glutamine avec une concentration de 6 mM.

#### *Principales voies métaboliques chez C. geophilum et L. bicolor.*

Les différences révélées au niveau des contenus cellulaires des deux champignons reflètent des métabolismes différents.

Chez *C. geophilum*, synthèse et dégradation du mannitol apparaissent jouer un rôle primordial dans le métabolisme carboné primaire. Un cycle du mannitol a été mis en évidence chez plusieurs ascomycètes (Hult *et al.*, 1980 ; Martin *et al.*, 1985 ; Martin *et al.*, 1988 ; Ramstedt *et al.*, 1986 ; Ramstedt *et al.*, 1987 ; Kulkarni, 1990) (Fig. IV-10 & IV-11) et son intervention chez *C. geophilum* serait compatible avec nos résultats. Ce cycle qui n'existerait pas chez les basidiomycètes alimente la glycolyse mais sa fonction spécifique n'est encore que putative. La formation du mannitol fait intervenir une deshydrogénase à NADH alors que son oxydation est catalysée par une deshydrogénase à NADPH (Fig. IV-10). Cette transhydrogénation ATP-dépendante pourrait conduire à une forte production de NADPH, notamment requise lors de l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  ou de la biosynthèse des acides gras. L'implication du cycle du mannitol dans la production de NADPH a été montrée par Hult et Gatenbeck (1978) chez *Alternaria alternata*, et par Niehaus et Dilts (1982) chez *Aspergillus parasiticus*. Cependant chez *Aspergillus nidulans*, Singh *et al.* (1988) ont indiqué que le cycle du mannitol ne fonctionnait pas de manière à répondre à la demande en NADPH. Enfin, pour

Jennings et Burke (1990), le cycle du mannitol pourrait jouer un rôle de dissipateur d'énergie (*energy spilling*).

Martin *et al.* (1985) ont montré l'existence du cycle du mannitol chez l'isolat SIV (alors considéré comme un isolat de *C. geophilum* mais plus proche des genres *Phialophora* et *Hymenoscyphus*; voir chapitre I) grâce à l'analyse du marquage intra-moléculaire du mannitol et du tréhalose par RMN du  $^{13}\text{C}$ . Dans notre analyse, après 12 h de marquage, le C1 du tréhalose est le plus enrichi en  $^{13}\text{C}$  (Fig. IV-4) : la majorité du tréhalose a donc été synthétisé directement à partir du [ $^{13}\text{C}$ ]glucose. Cependant, le C6 du tréhalose est également, à un degré moindre, plus enrichi en  $^{13}\text{C}$  que les positions 2, 3, 4 et 5 (Tableau IV-1). Ainsi, une partie du tréhalose est formé après passage du [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]glucose dans des voies métaboliques (*metabolic active pool*) permettant une redistribution isotopique intramoléculaire ou *scrambling*. Cette redistribution intramoléculaire se traduit par un 'passage' du  $^{13}\text{C}$  du C1 du tréhalose vers le C6. Ce *scrambling* est possible : (i) lorsque le champignon utilise une source néoglucogénique de carbone. En effet, le fonctionnement du couple Fru-1,6-P<sub>2</sub> aldolase et triose-P isomérase d'une part, celui du cycle dit *futile* phosphofructokinase / Fru-1,6-P<sub>2</sub>-ase d'autre part, permet au marquage émanant du [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]glucose de se retrouver au niveau du C6 du fructose-1,6-P<sub>2</sub> puis du fructose-P, du glucose-P et enfin au niveau du C6 du tréhalose. Cette voie métabolique a déjà été observée chez la Levure *Saccharomyces cerevisiae* (Den Hollander *et al.*, 1981). Cependant cette hypothèse impliquerait un fonctionnement important de la néoglucogénèse, simultanément à la glycolyse, ce qui est peu vraisemblable du fait de la répression catabolique des gènes concernés. (ii) Une deuxième possibilité implique la transaldolase du cycle des pentose-P, qui assure le passage du marquage du C1 du fructose-1,6-P<sub>2</sub> vers le C6. Par contre, cette dernière réaction n'autorise pas le passage inverse du marquage du C6 vers le C1. Or, après avoir alimenté le mycélium avec du [ $6\text{-}^{13}\text{C}$ ]glucose, le signal émanant de la résonance du C1 du tréhalose était presque aussi intense que celui du C6. La participation de cette voie métabolique chez *C. geophilum* n'est donc pas quantitativement importante et n'explique pas la redistribution isotopique observée. (iii) Enfin, lorsque le tréhalose est synthétisé à partir de fructose-6-P provenant du cycle du mannitol (Fig. IV-5), la symétrie de la molécule de mannitol conduit à une répartition équivalente du  $^{13}\text{C}$  sur les carbones 1 et 6 de ce polyol. Par voie de conséquence, 50% de ce marquage se retrouve au niveau du C6 du tréhalose. Cette hypothèse apparaît la plus vraisemblable, d'autant plus que le mannitol constitue d'après nos résultats, le métabolite carboné soluble dominant chez *C. geophilum*.

D'après notre analyse, près de 60% du tréhalose aurait été synthétisé après passage par le cycle du mannitol.

Chez *L. bicolor*, nous avons observé, en sus du fort enrichissement du C1 du tréhalose, un enrichissement du C6 par rapport à l'abondance naturelle (Fig. IV-8). Nous avons expliqué cette redistribution intramoléculaire du  $^{13}\text{C}$  chez *C. geophilum* par un passage via le cycle du mannitol. Même si l'absence de détection du mannitol chez *L. bicolor* n'exclut pas l'existence d'un cycle du mannitol, il est davantage plausible que cette redistribution isotopique intervienne lors du cycle des pentoses-P (Fig. IV-11). Toutefois, nous n'avons pas effectué dans le cas de *L. bicolor* de marquage utilisant du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose qui nous aurait permis de confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, il semble que les carbones 3 et 4 du tréhalose soient davantage enrichis que les carbones 2 et 5 (Tableau IV-2). Brosnan (1982) et Bago (1999) ont observé des marquages supérieurs pour les carbones 3 et 4 du tréhalose par rapport aux carbones 2 et 5 lorsque du  $[^{13}\text{C}]\text{CO}_2$  est fourni comme précurseur. Ce  $[^{13}\text{C}]\text{CO}_2$  entre alors dans le métabolisme fongique via la pyruvate carboxylase au niveau du cycle des acides tricarboxyliques et peut donner du tréhalose marqué au niveau des carbones 3 et 4 après un passage par la néoglucogenèse. Or, d'après les enrichissements équivalents en  $^{13}\text{C}$  au bout de 12H et 36H des différents carbones de la glutamine, l'entrée de carbone dans le cycle de Krebs s'est faite aussi bien grâce au fonctionnement de la pyruvate déshydrogénase que grâce à celui de la pyruvate carboxylase (Cf. Martin, 1991). Mais dans notre cas, cela reste très spéculatif car il faudrait que la concentration en  $\text{CO}_2$  marqué soit suffisante pour aboutir à un marquage significatif au niveau du tréhalose, et que la néoglucogenèse fonctionne de manière non négligeable simultanément à la glycolyse.

La concentration en acides aminés accumulés, essentiellement la glutamine, l'acide glutamique, l'arginine et l'alanine est plus élevée chez *C. geophilum* que chez *L. bicolor*. Le marquage intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  de ces acides aminés lors du marquage au  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose indique que ces acides aminés sont synthétisés via des acides organiques du cycle de Krebs (pyruvate,  $\alpha$ -cétoglutarate). L'entrée du pyruvate, provenant de l'assimilation du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose par la glycolyse, s'effectue essentiellement par l'action combinée de la pyruvate déshydrogénase et de la pyruvate carboxylase (Martin, 1985). En effet, l'acide glutamique et la glutamine sont marqués au niveau des carbones 2 et 3, alors que dans le second cas, acide glutamique et glutamine se retrouvent marqués au niveau du C4.

*Comportements métaboliques de C. geophilum et L. bicolor en conditions de stress hydrique.*

Après 12 h ou 36 h de marquage au [1-<sup>13</sup>C]glucose, les enrichissements en <sup>13</sup>C des différents métabolites chez les deux espèces, sont diminués par rapport aux expériences réalisées sans stress. La présence de PEG aurait donc ralenti les processus d'absorption du [<sup>13</sup>C]glucose, mais les flux métaboliques sont toutefois maintenus de façon à permettre les synthèses de sucres et d'acides aminés. Qualitativement, les patrons d'incorporation du <sup>13</sup>C sont identiques. La concentration des métabolites carbonés solubles dominants (tréhalose chez *L. bicolor*, mannitol chez *C. geophilum*) n'augmente pas après induction du stress osmotique ; ces métabolites ne joueraient donc pas un rôle dans l'osmorégulation. Nous n'avons pas non plus observé une augmentation de la concentration d'autres polyols tels que l'arabitol et l'erythritol (*Neocosmospora vasinfecta* ; Kelly et Budd, 1991) ou l'arabinitol et le glycerol (*Cladosporium fulvum*, Clark *et al.* ; soumis) induit par le stress osmotique.

Notre travail ne permet pas de distinguer des différences de réponse entre *C. geophilum* réputé être résistant au stress hydrique et *L. bicolor* qui y est sensible (Coleman *et al.*, 1989). Le stress osmotique appliqué n'a peut être pas été suffisamment élevé ou suffisamment diversifié pour mettre en évidence des différences métaboliques. Posas *et al.* (2000) insistent en effet sur le fait que la nature et l'amplitude de la réponse diffèrent selon le type, l'intensité et la durée du stress. Lors de l'application du stress osmotique transitoire, nous n'avons atteint que des valeurs de -0,90 Mpa, similaires aux potentiels hydriques les plus bas que nous ayons observés dans la hêtraie lorraine durant les saisons de végétation 1999 et 2000 (Cf. chapitre III). Ces potentiels peuvent paraître encore relativement élevés, même si Neves Machado (1995) mettait en évidence des différences de réponse en termes de survie et de croissance entre *C. geophilum* et d'autres champignons pour des potentiels hydriques de cet ordre.

Nous pourrions cependant supposer que les différences observées dans le métabolisme carboné primaire des deux espèces testées pourraient expliquer en partie la plus grande résistance au stress hydrique de *C. geophilum*. Le rôle de dissipation d'énergie, imputé par Jennings et Burke (1990) au cycle du mannitol, pourrait être très important en cas de stress. En effet, quand la croissance d'un organisme est réduite, il se produit un flux métabolique trop important, et des mécanismes destinés à réduire l'excès d'énergie sont alors nécessaires. D'autre part la RMN du <sup>13</sup>C ne permet pas de caractériser les métabolites dont la concentration est inférieure à 1 mM ou le

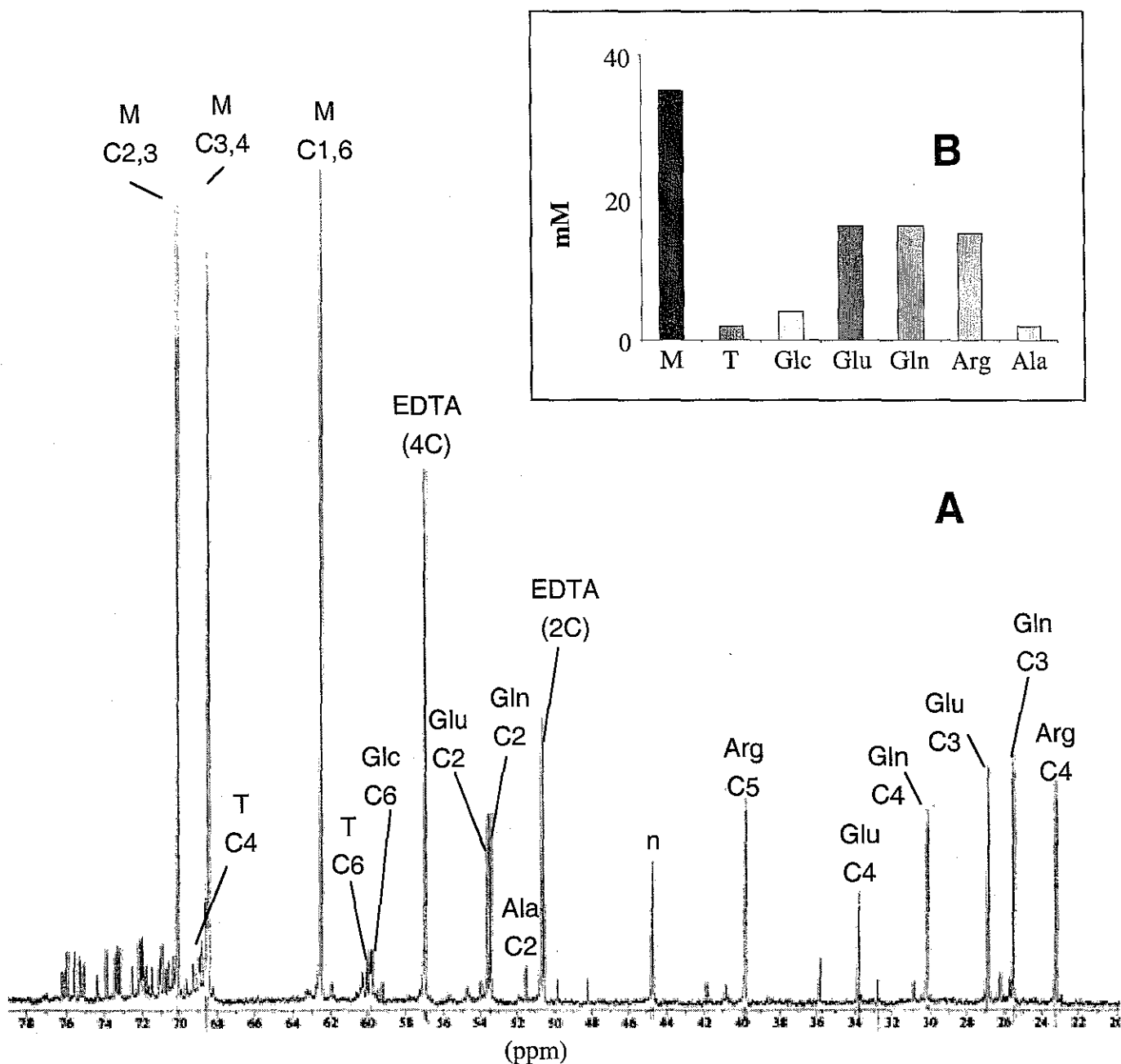
CO<sub>2</sub> respiré. Le catabolisme respiratoire ou les synthèses de lipides ou de métabolites secondaires pourraient avoir un rôle clef dans la résistance au stress hydrique de *C. geophilum*.

L'intervention possible de métabolites carbonés dans la résistance au stress hydrique n'a pas été mise en évidence chez *C. geophilum* ou *L. bicolor*. Il faut cependant noter que malgré les stress imposés lors de notre étude, le métabolisme primaire de ces deux champignons est resté très actif : la respiration oxydative du glucose, le cycle de Krebs et la biosynthèse des acides aminés et des glucides sont restés fonctionnels. Ces champignons semblent donc adaptés à des niveaux élevés de sécheresse édaphique que le mycélium extramatriciel doit rencontrer en permanence lors de sa croissance dans le sol. Pour expliquer ce type d'adaptation, des hypothèses autres que l'intervention d'osmolytes protecteurs sont envisageables. Chez *C. geophilum* notamment, les parois épaisses qui renferment de grandes quantités de mélanines fongiques (Pigott, 1982 a,b) pourraient constituer une barrière de résistance au stress hydrique; les mélanines sont connues pour leurs propriétés anti-dessicantes (Bell et Wheeler, 1986 ; Butler *et al.*, 2001). Enfin, d'autres composés tels que des protéines protectrices : protéines LEA (*Late Embryogenesis Accumulated proteins*) ou protéines chaperonnes sont également susceptibles de jouer un rôle dans cette résistance au stress osmotique, comme observé chez la Levure (Swire-Clark *et al.*, 1999).

## Remerciements

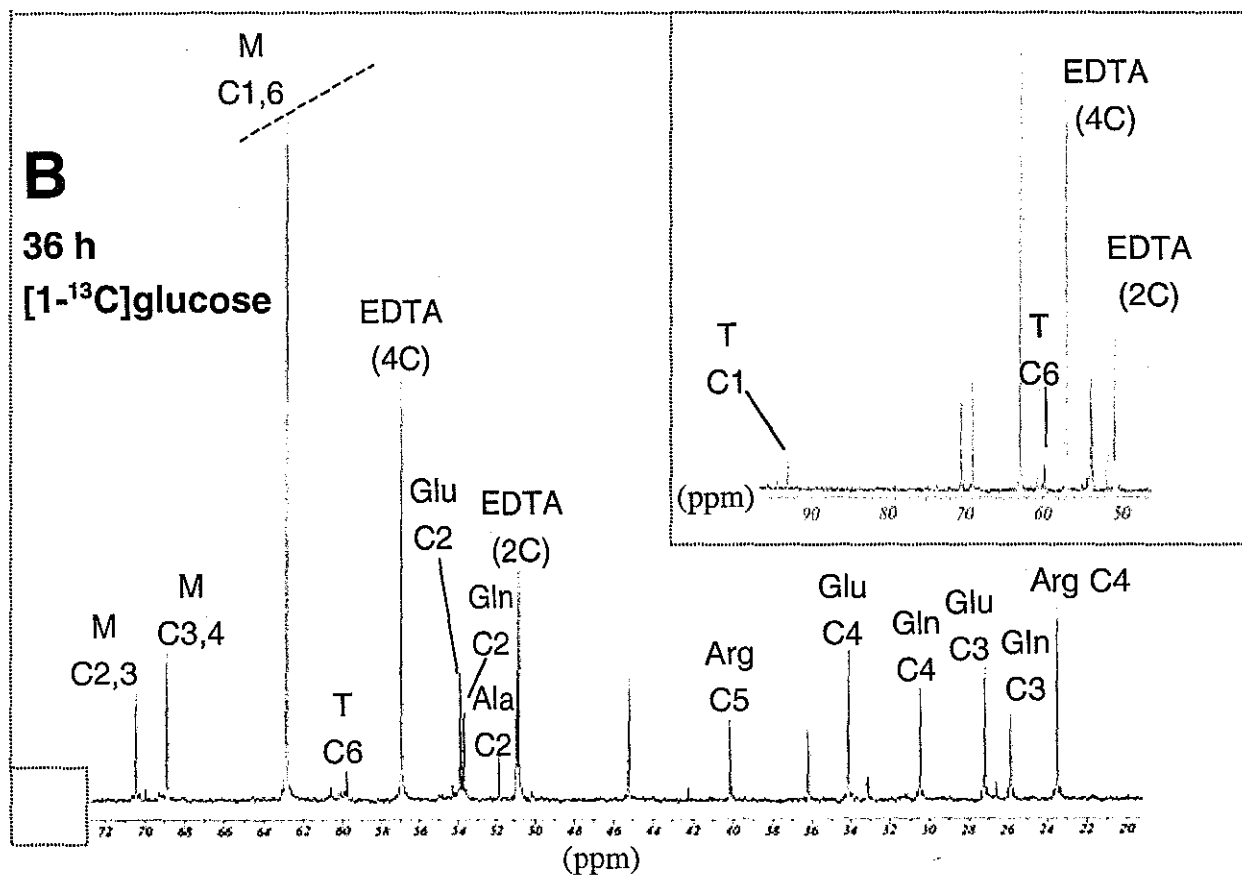
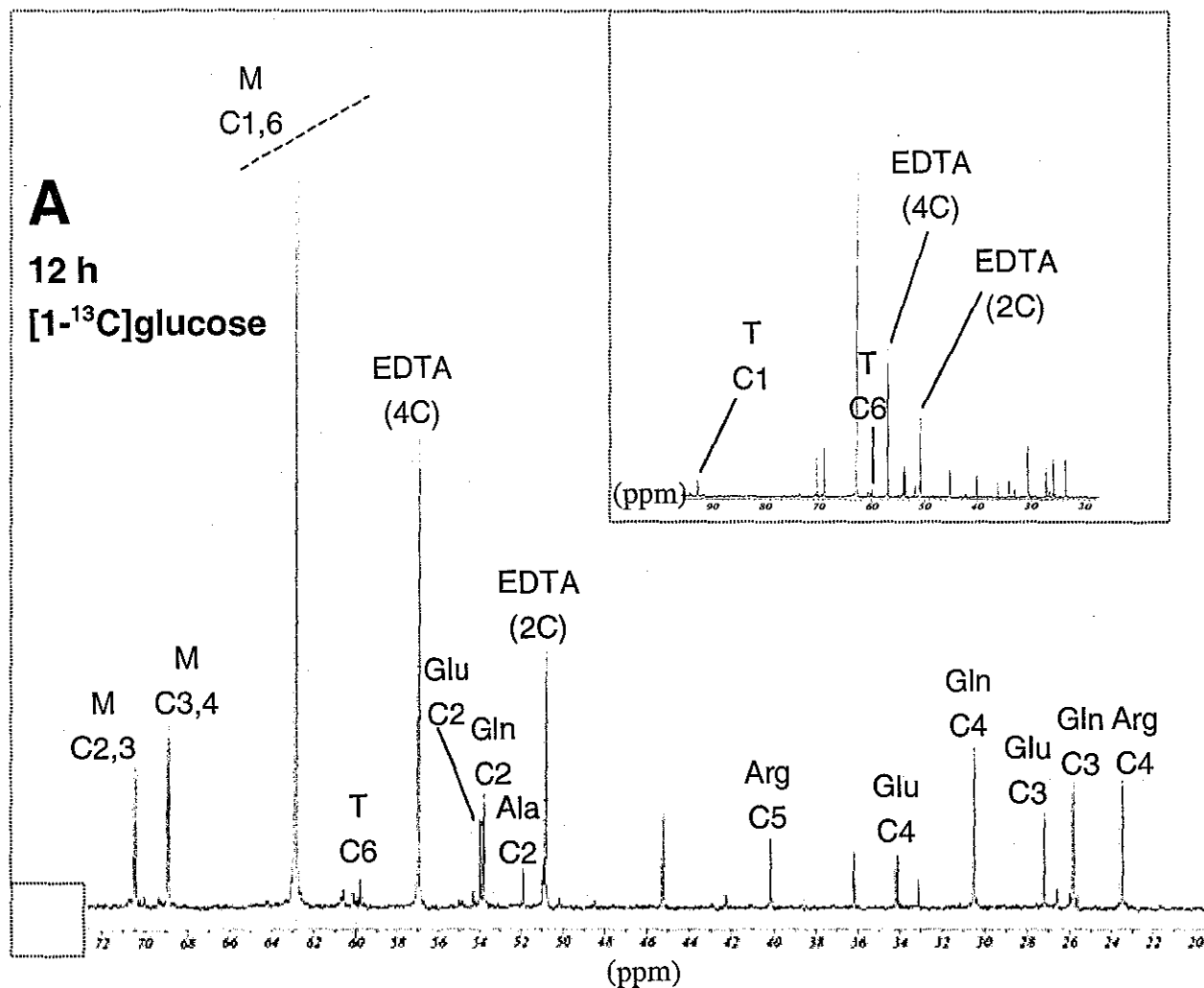
Je tiens à remercier le Professeur P. Rubini et l'ensemble de son équipe (Laboratoire de chimie physique organique et colloïdale, UHP, Nancy), qui ont largement contribué à l'analyse en résonance magnétique nucléaire du <sup>13</sup>C.

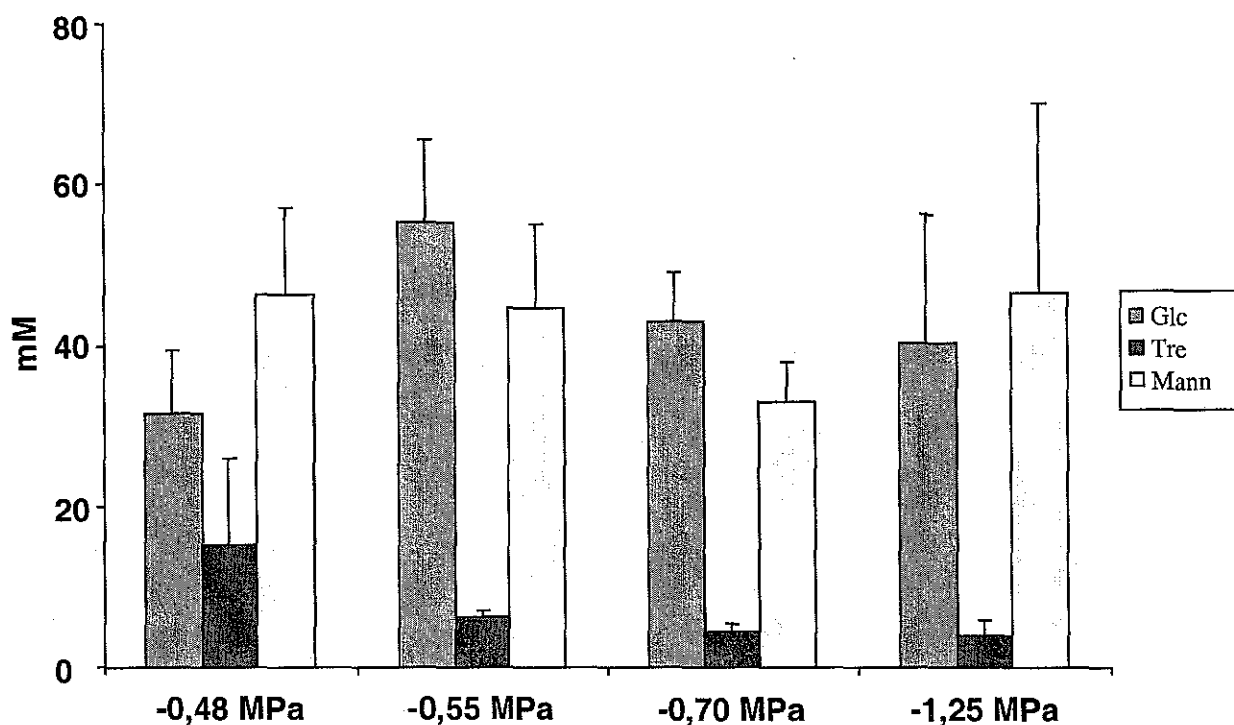
## **Figures IV-1 à IV-9**



**Figure IV-1.** Spectrogramme RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) en abondance naturelle (1,1%  $^{13}\text{C}$ ) d'un extrait mycélien de *Cenococcum geophilum* cultivé pendant 7 semaines sur un milieu de Pachlewski P5 modifié (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ). (A) Une partie du spectre RMN comprise entre 20 et 76 ppm comprenant les groupes méthyls, aldéhydes et alcools est présentée. Les extraits sont dissouts dans une solution aqueuse 10mM d'acide ethylenediaminetétraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbones du mannitol (M), du tréhalose (T), du glucose (Glc), de la glutamine (Gln), de l'acide glutamique (Glu), de l'arginine (Arg) et de l'alanine (Ala) sont identifiés. Un pics (n) n'a pu être identifié. Le mannitol étant un hexitol symétrique ne présente que trois résonances. La hauteur des pics est directement proportionnelle à la concentration des groupements chimiques détectés. (B) Les concentrations des composés identifiés sur le spectrogramme, calculées sur la base d'une comparaison des différents pics avec les pics du standard interne (EDTA 10mM), sont présentées. La teneur en eau intracellulaire du mycélium est voisine de 90%.

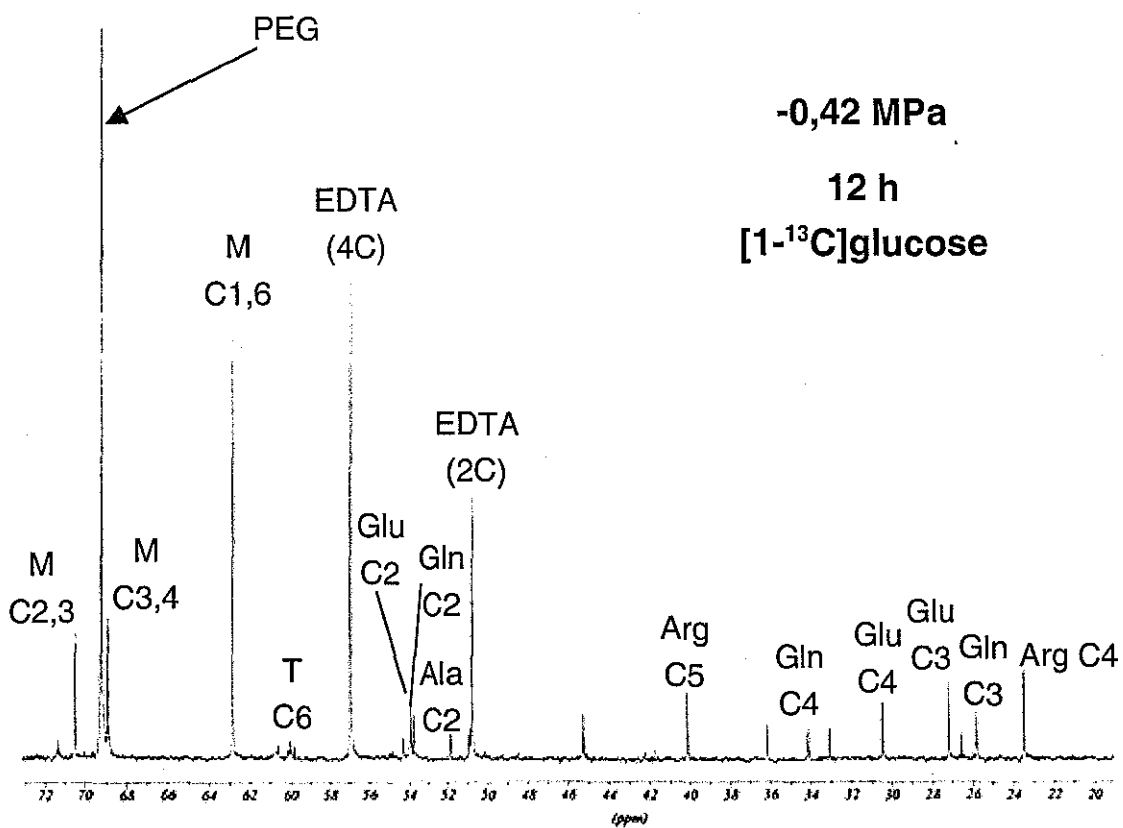
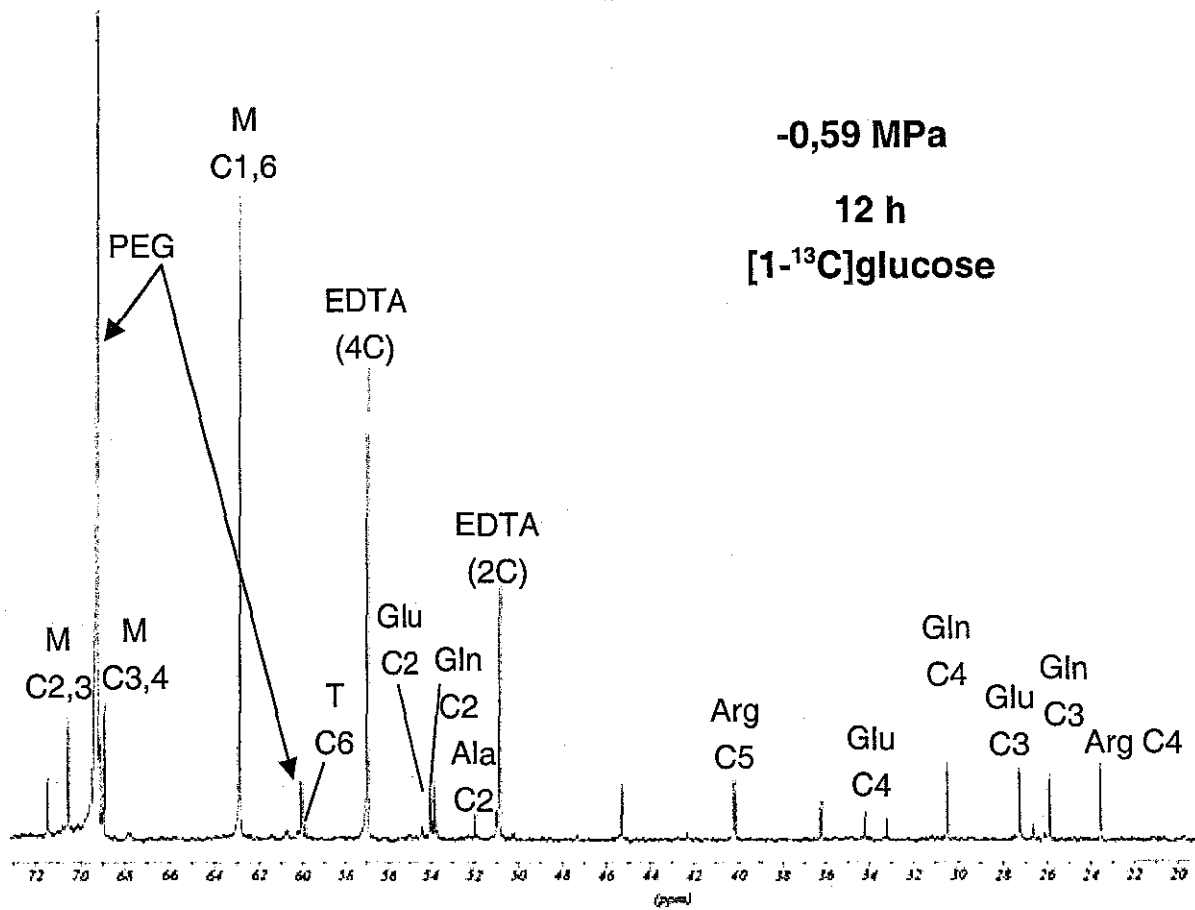
**Figure IV-2.** Spectrogrammes RMN du  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) acquis lors de l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose (5 mM) pendant (A) 12 H ou (B) 36H d'un extrait mycelien de *C. geophilum* provenant de (A) 0,032 g (masse sèche) ou (B) 0,053 g (masse sèche) de mycelium. Les mycelia ont été cultivés pendant 5 semaines sur milieu de Pachlewski P5 (110 mM glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) puis placés pendant 48 H sur un milieu de Pachlewski modifié (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) avant d'être cultivés sur un milieu de Pachlewski contenant 5 mM de  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose. Les extraits méthanoliques des composés solubles ont été dissouts dans une solution aqueuse 10mM d'acide ethylenediaminetétraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbones du mannitol (M), du tréhalose (T), de la glutamine (Gln), de l'acide glutamique (Glu), de l'arginine (Arg) et de l'alanine (Ala) ont été identifiés.



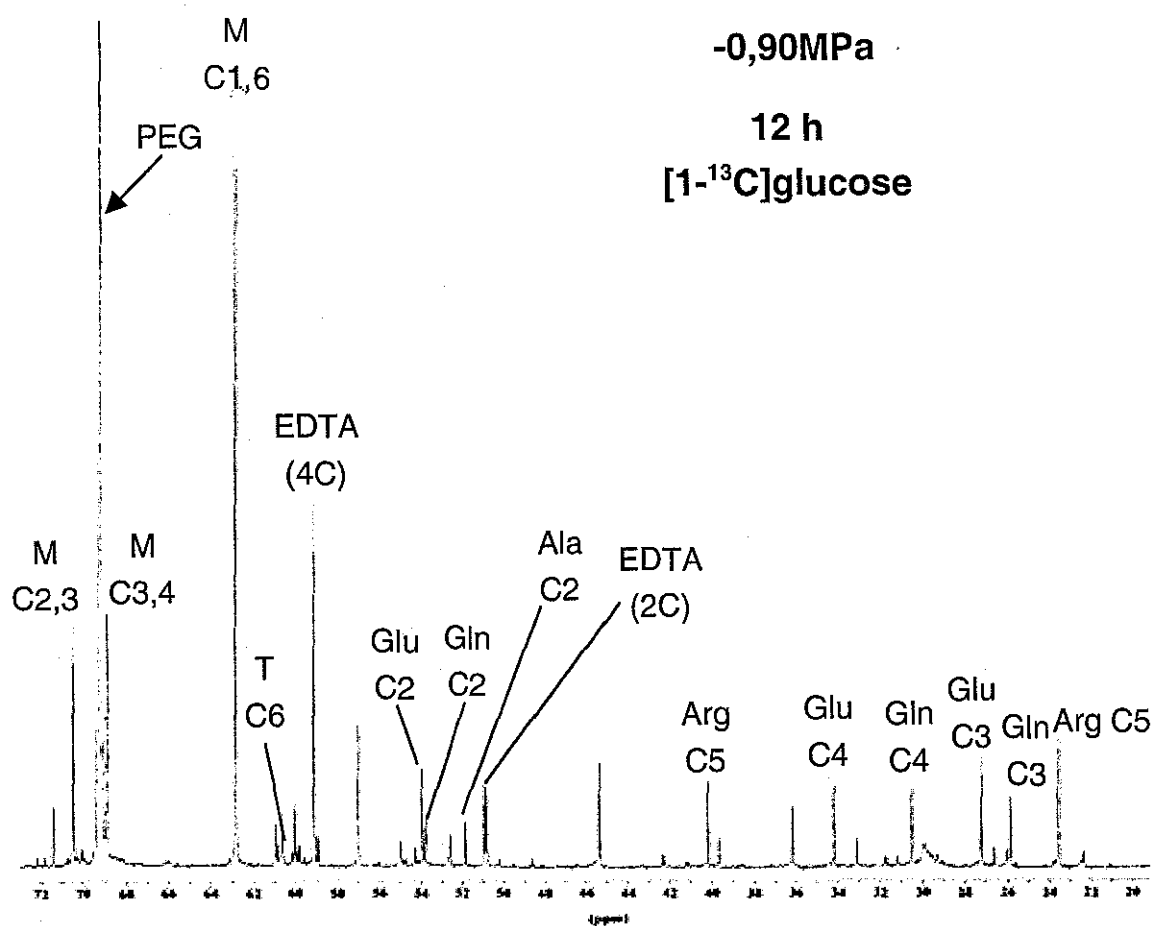


**Figure IV-3.** Diagramme illustrant les concentrations (en mM) des composés identifiés sur les spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle obtenus à partir d'extraits mycéliens de *Cenococcum geophilum* cultivés pendant 7 semaines sur un milieu de Pachlewski P5 liquide (110 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) et additionné de PEG en concentration croissante, induisant des potentiels hydriques de -0,48, -0,55, -0,70 et -1,25 MPa. Les concentrations sont calculées sur la base d'une comparaison des différents pics RMN avec les pics du standard interne (EDTA à 10mM). Les écarts-type des trois répétitions effectuées sont représentés sous forme de barre d'erreur surmontant chacune des barres de l'histogramme.

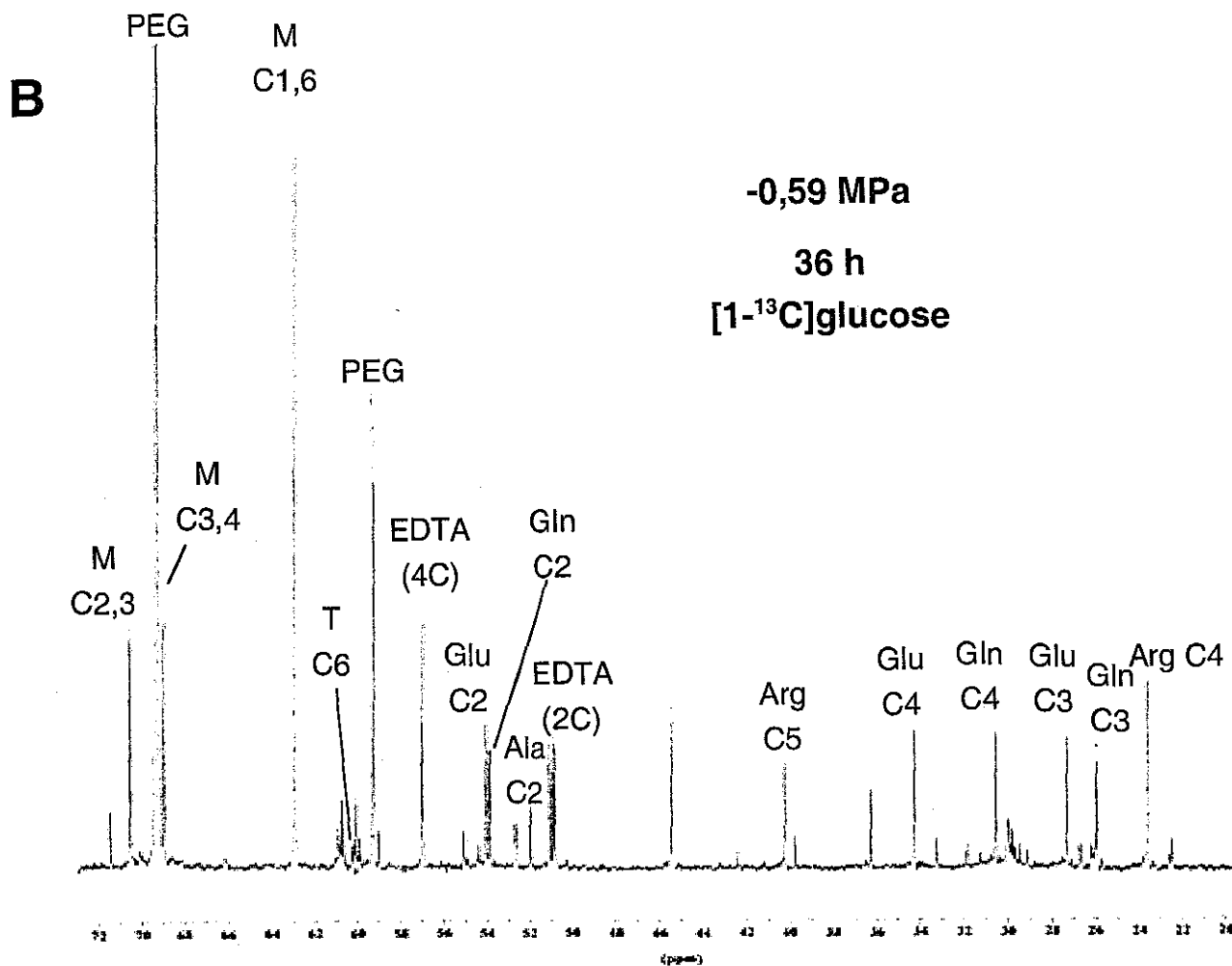
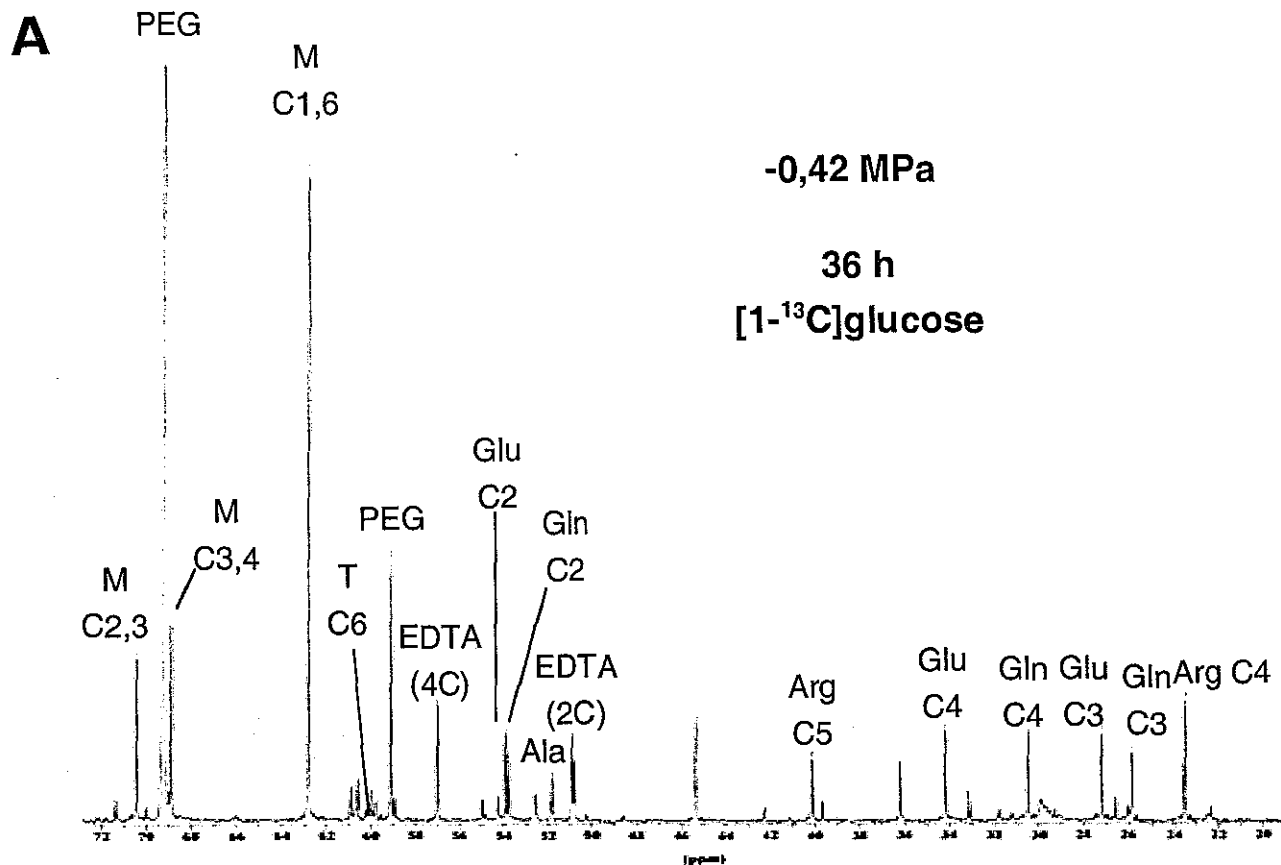
**Figure IV-4.** Spectrogrammes RMN du  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) acquis lors de l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose (5 mM) par *C. geophilum*. Les extraits mycéliens proviennent de (A) 0,032 g (masse sèche), (B) 0,035g (masse sèche) ou (C) 0,275 g (masse sèche) de mycelium. Les mycelia ont été cultivés pendant 5 semaines sur milieu de Pachlewski P5 (110 mM glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) puis placés pendant 48 h sur un milieu de Pachlewski modifié (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) avant d'être cultivés pendant **12 h** sur un milieu de marquage additionné de PEG en concentration croissante, induisant des potentiels hydriques de -0,42, -0,59 et -0,90 MPa. Les échantillons ont été dissouts dans une solution aqueuse 10 mM d'acide ethylenediaminetétraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbone du mannitol (M), du tréhalose (T), de la glutamine (Gln), de l'acide glutamique (Glu), de l'arginine (Arg) et de l'alanine (Ala) ont été identifiés.

**A****B**

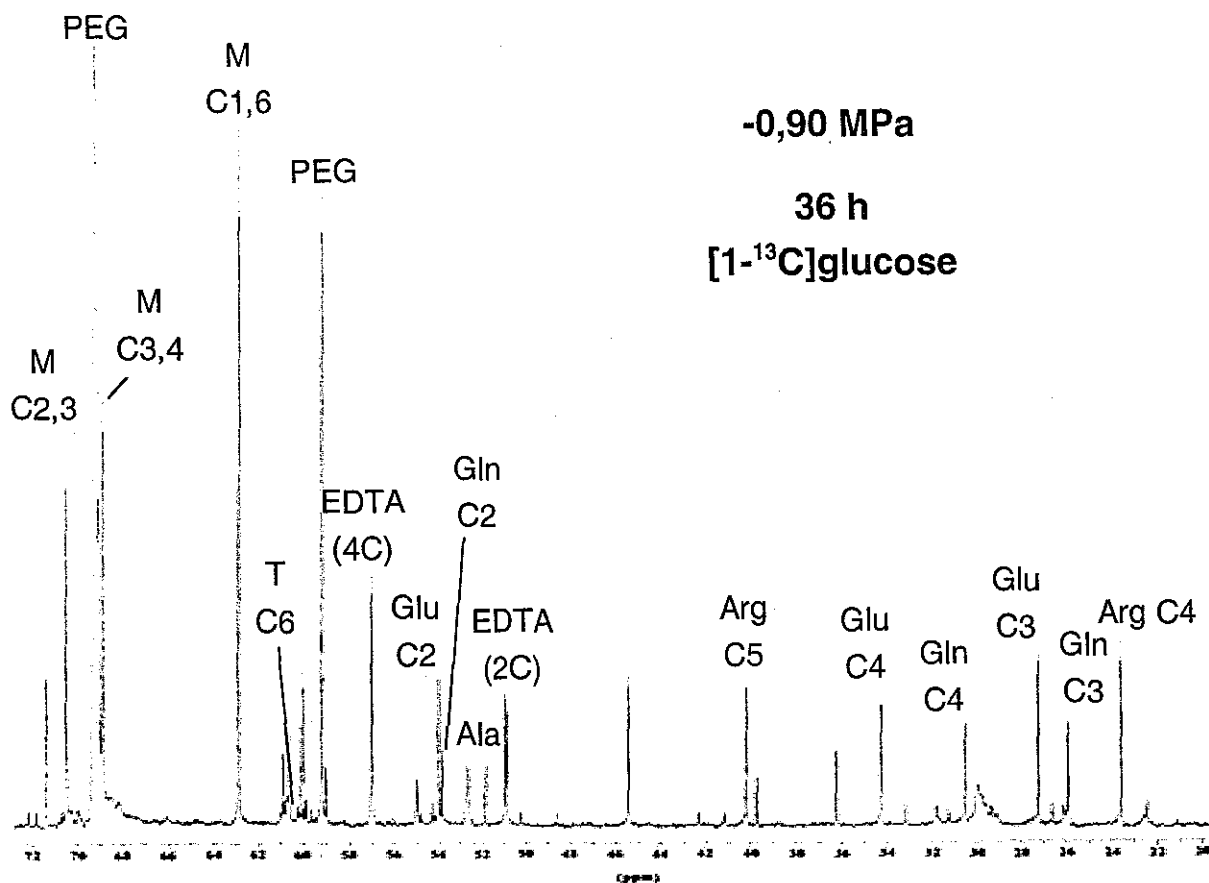
**C**

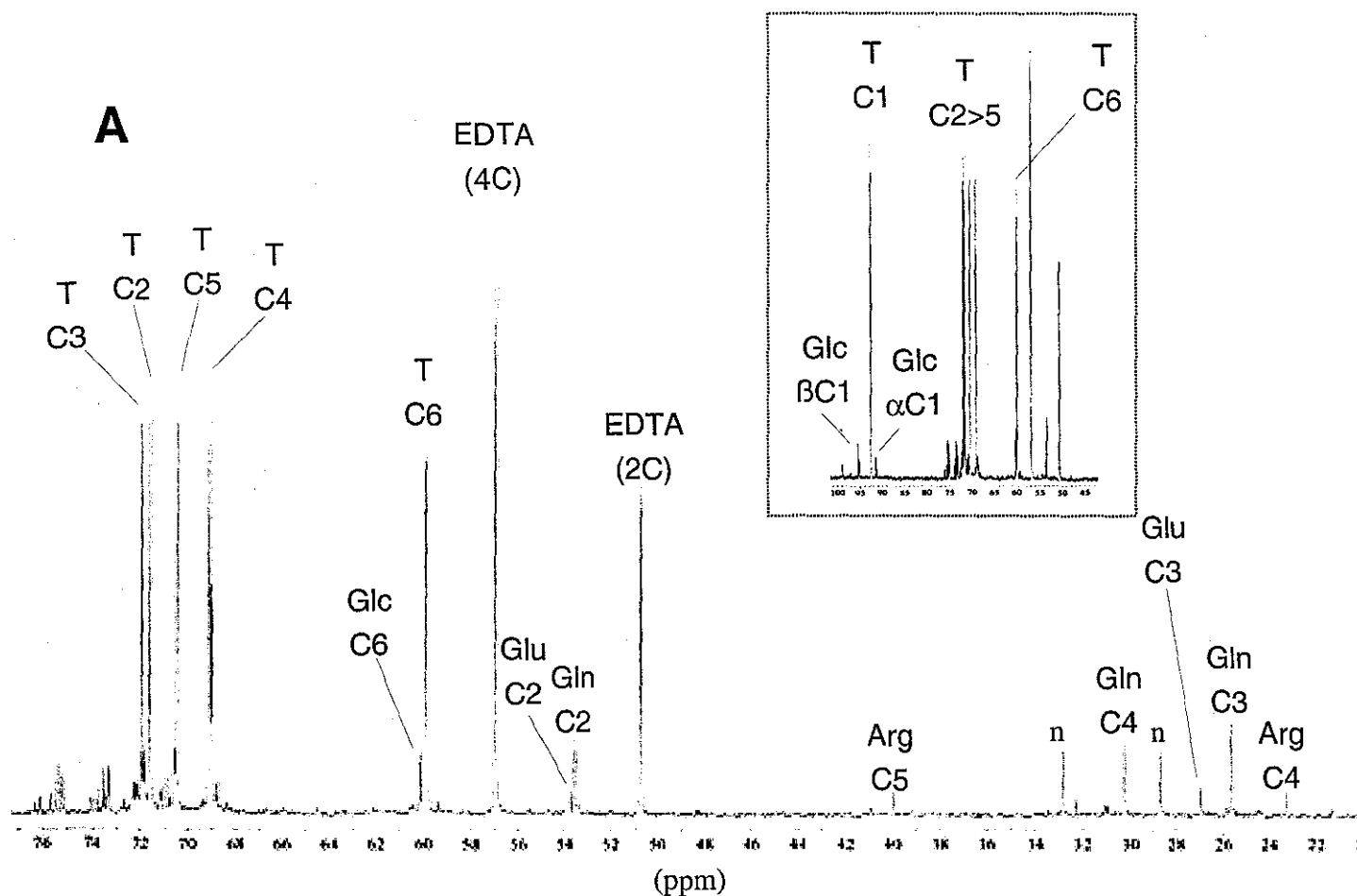


**Figure IV-5.** Spectrogrammes RMN du  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) acquis lors de l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose (5 mM) par *C. geophilum*. Les extraits mycéliens proviennent de (A) 0,270 g (masse sèche), (B) 0,258g (masse sèche) ou (C) 0,298 g (masse sèche) de mycelium. . Les mycelia ont été cultivés pendant 5 semaines sur milieu de Pachlewski P5 (110 mM glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ), puis placés pendant 48 h sur un milieu de Pachlewski modifié (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) avant d'être cultivés pendant **36 h** sur un milieu de marquage additionné de PEG en concentration croissante, induisant des potentiels hydriques de -0,42, -0,59 et -0,90 MPa. Les échantillons ont été dissouts dans une solution aqueuse 10 mM d'acide ethylenediaminetétraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbone du mannitol (M), du tréhalose (T), de la glutamine (Gln), de l'acide glutamique (Glu), de l'arginine (Arg) et de l'alanine (Ala) ont été identifiés.

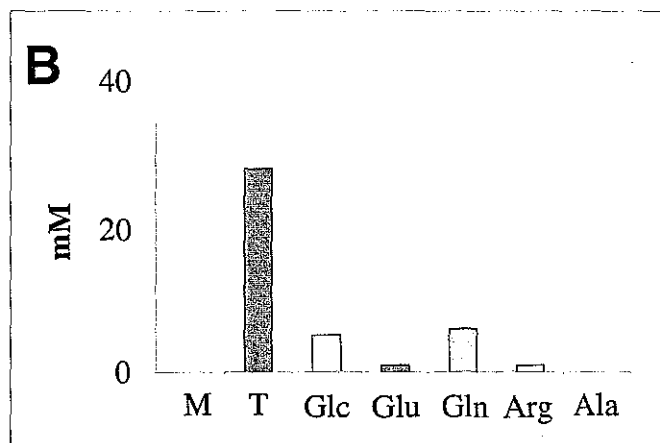


C

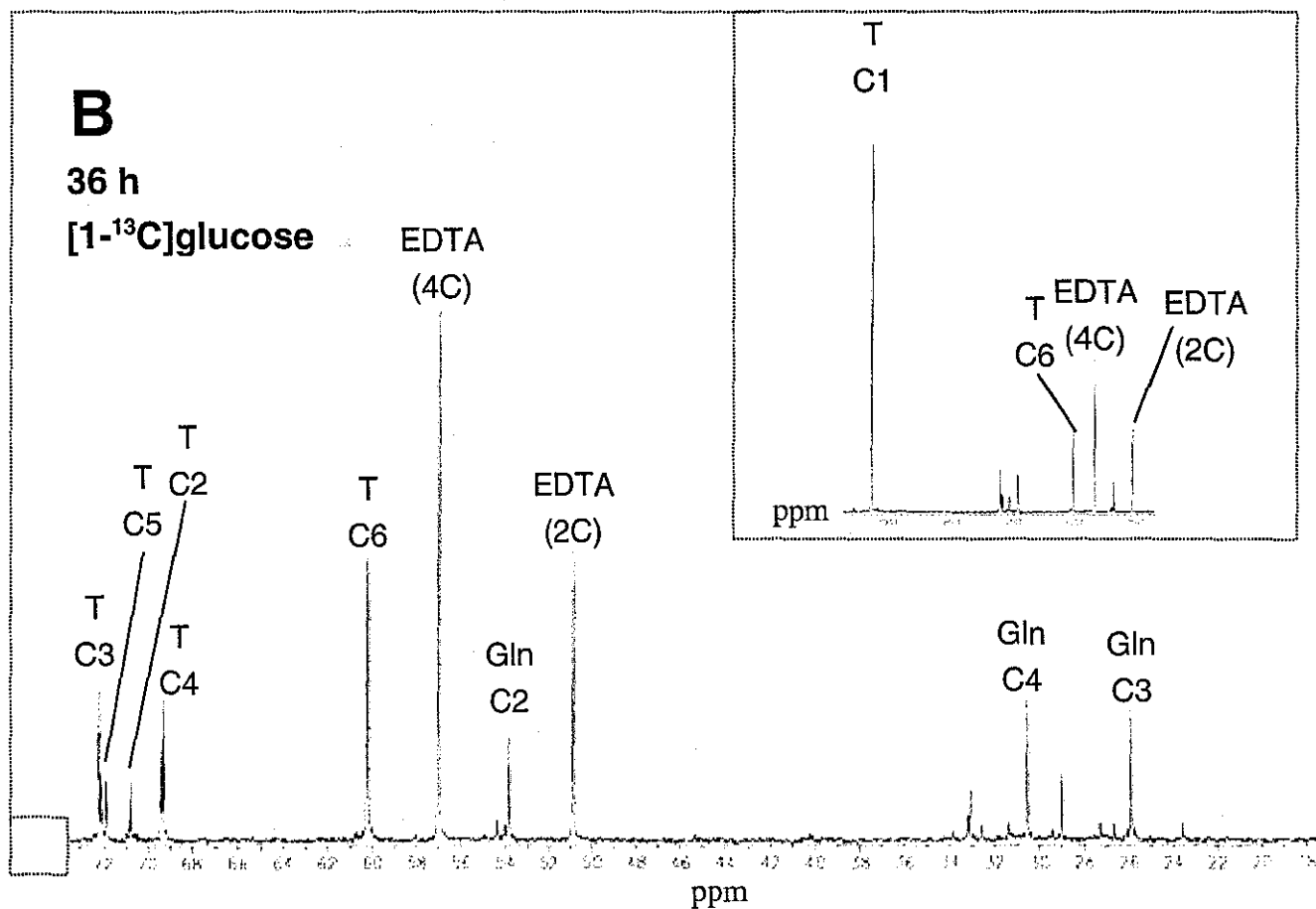
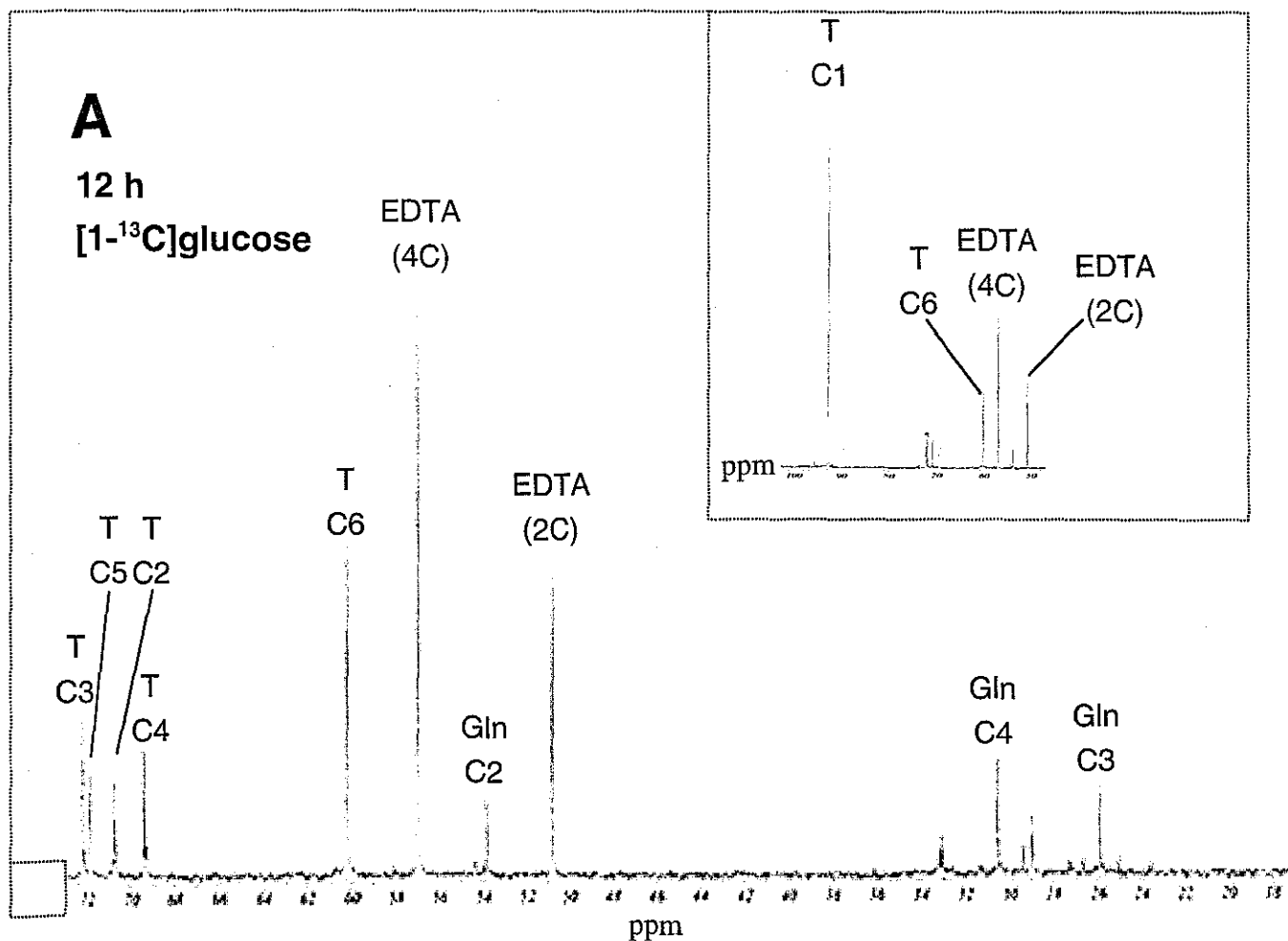




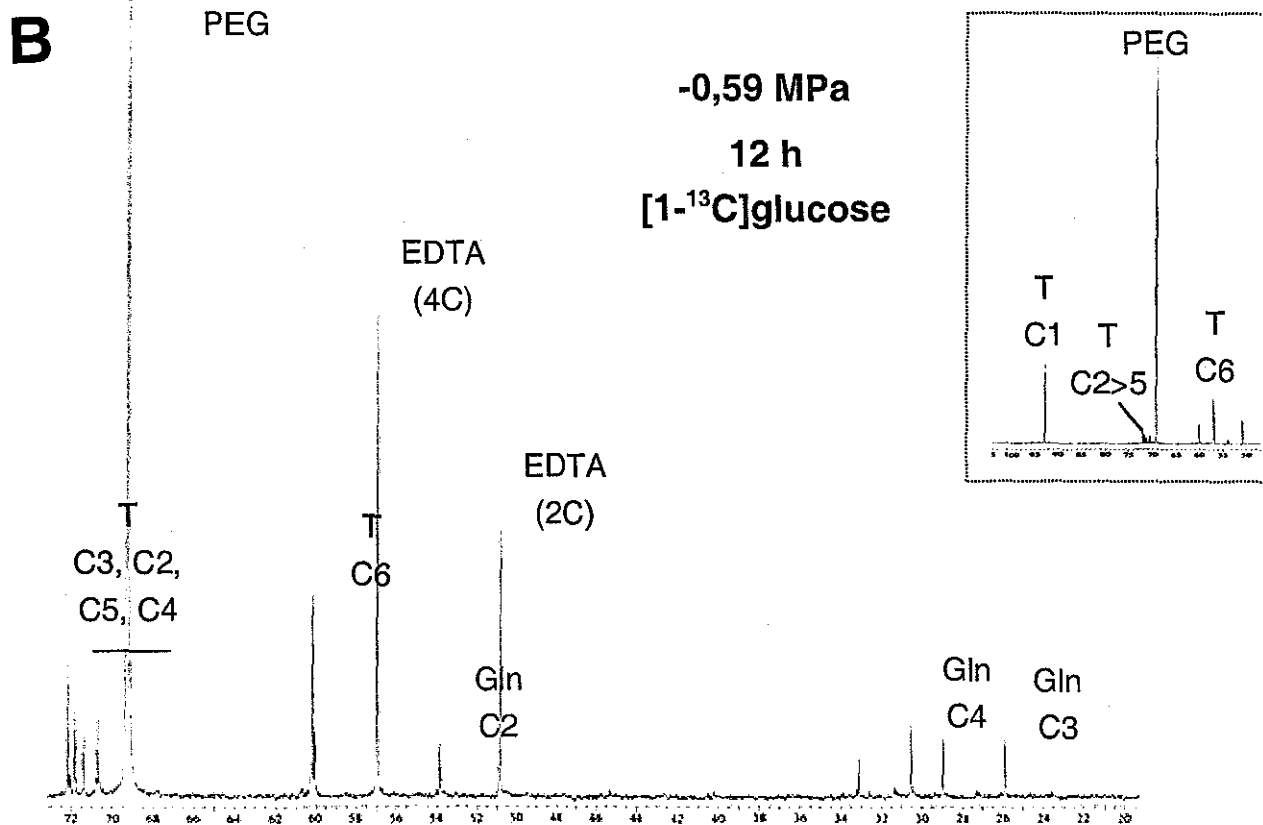
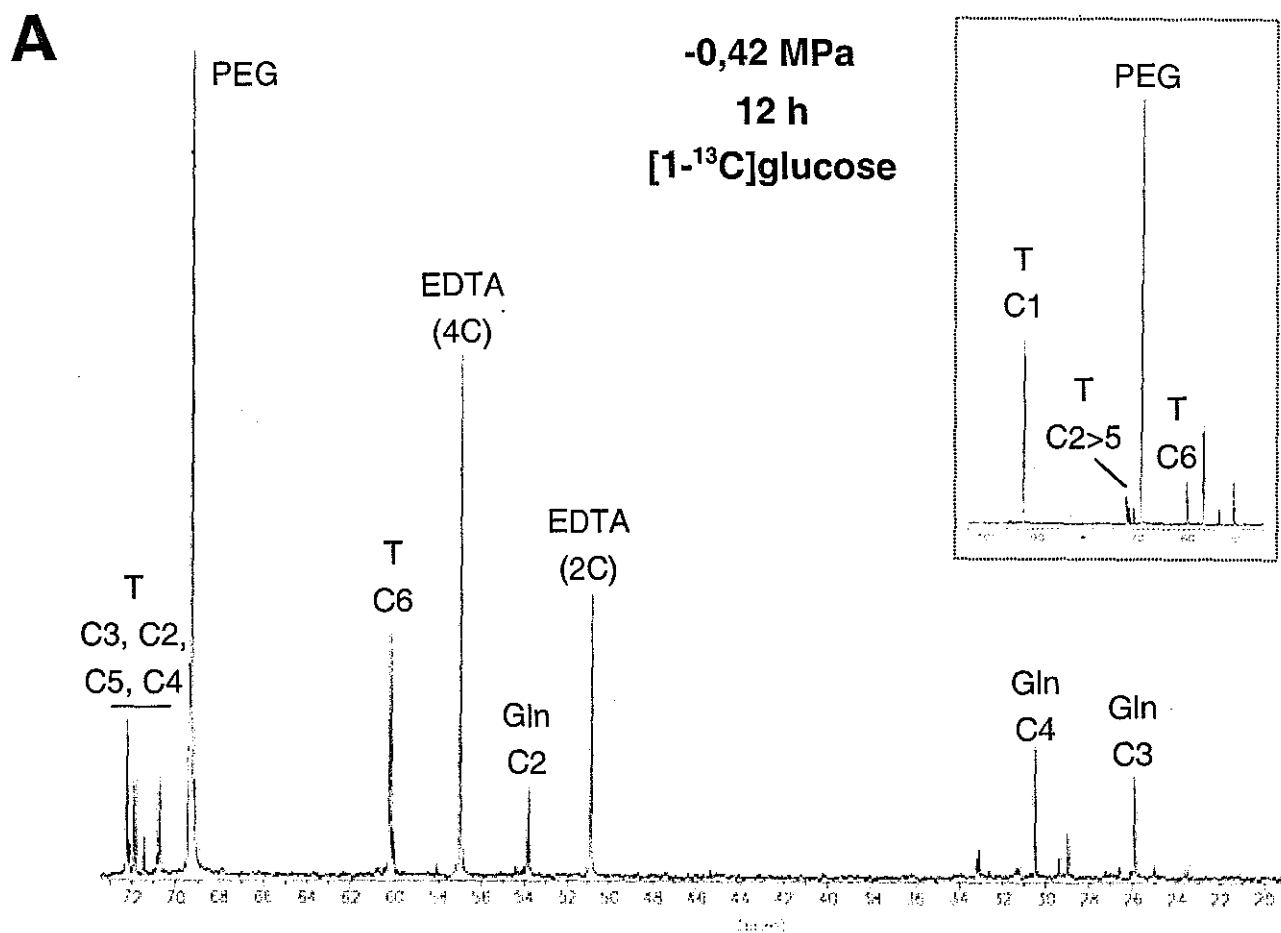
**Figure IV-6.** Spectrogramme RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) en abondance naturelle (1,1%  $^{13}\text{C}$ ) d'un extrait mycelien de *Laccaria bicolor* cultivé pendant 7 semaines sur un milieu de Pachlewski P5 (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ). (A) Une partie du spectre RMN comprise entre 20 et 76 ppm et contenant la plupart des résonances des groupements chimiques  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CHOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$  est présentée. Les extraits sont dissouts dans une solution aqueuse 10mM d'acide éthylenediaminetetraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbones du tréhalose (T), de la glutamine (Gln) et de l'acide glutamique (Glu) sont identifiés. Deux pics (n) n'ont pu être attribués à un composé connu. (B) Les concentrations des composés identifiés sur le spectrogramme, calculées sur la base d'une comparaison des différents pics avec les pics du standard interne



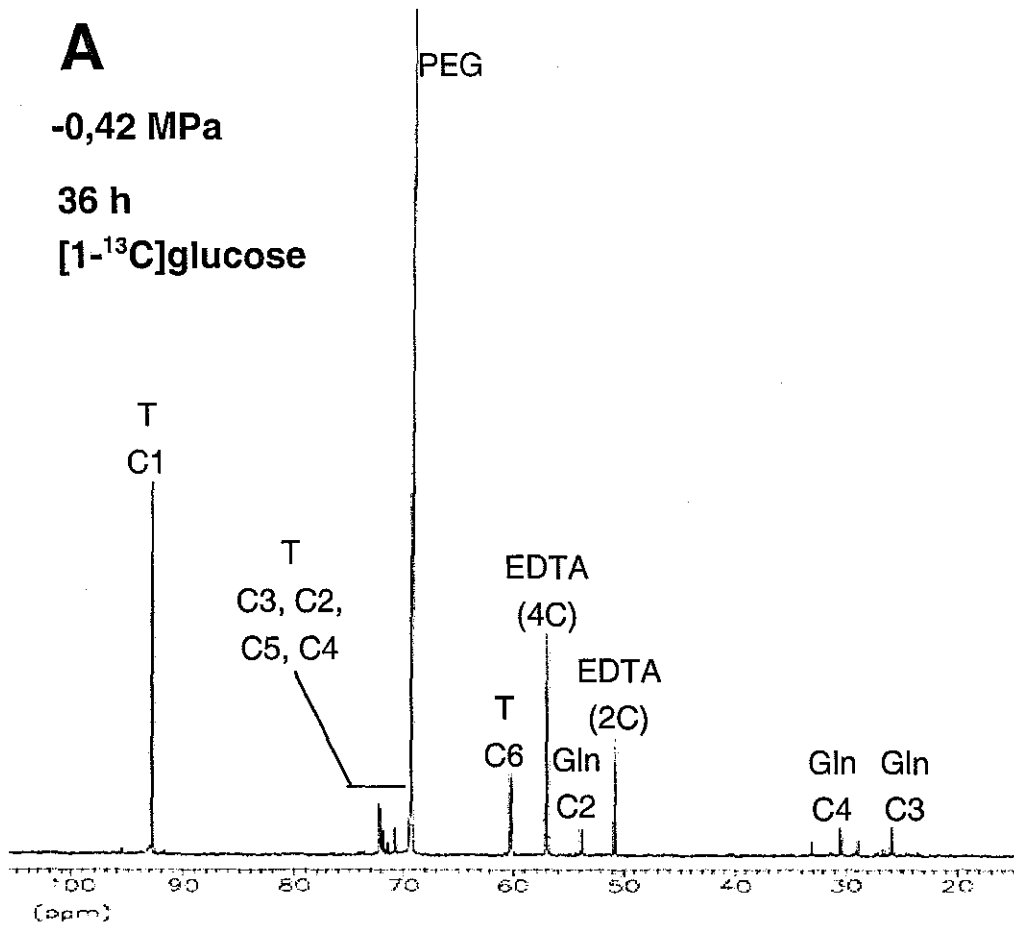
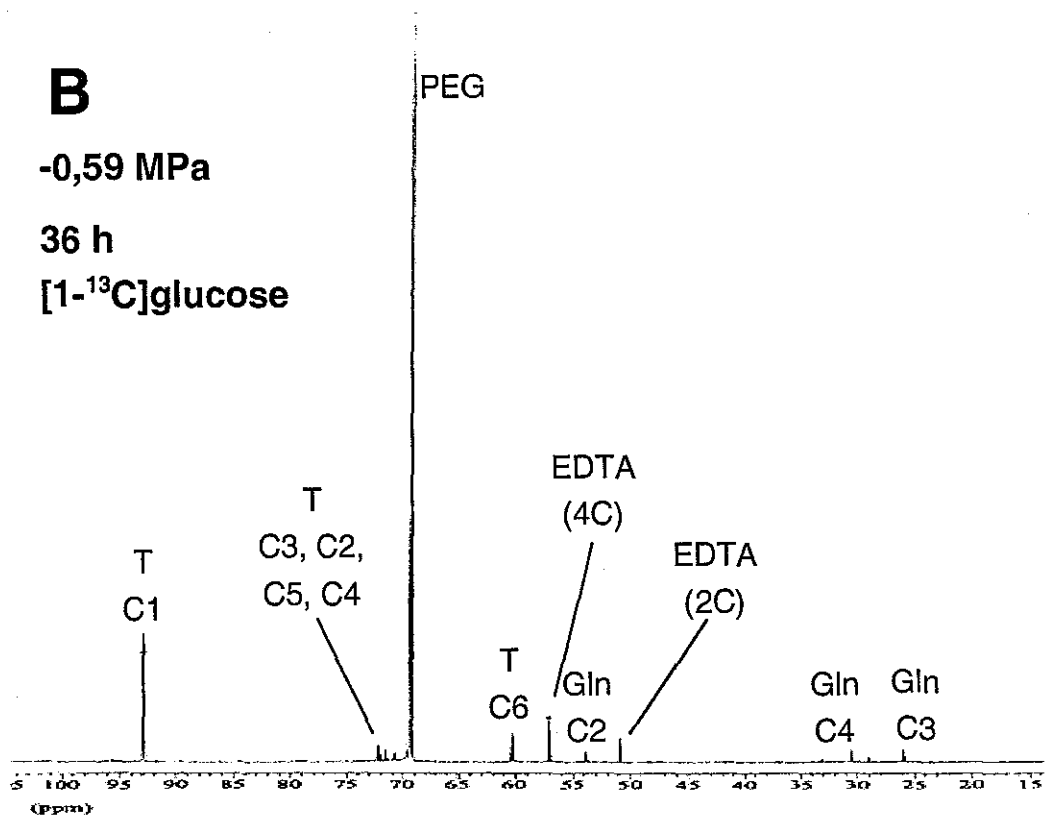
**Figure IV-7.** Spectrogrammes RMN du  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) des composés carbonés solubles d'un extrait mycélien de *L. bicolor* cultivé sur  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose (5 mM) pendant (A) 12 H ou (B) 36H. Les extraits myceliens proviennent de (A) 0,0285 g (masse sèche) ou (B) 0,0240 g (masse sèche) de mycelium. Les mycelia ont été cultivés pendant 7 semaines sur milieu de Pachlewski P5 (110 mM glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) puis placés pendant 48 h sur un milieu de Pachlewski modifié (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) avant d'être cultivés sur un milieu de marquage. Les échantillons sont dissouts dans une solution aqueuse 10mM d'acide éthylenediaminetétraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbone du tréhalose (T), de la glutamine (Gln), et de l'acide glutamique (Glu) sont identifiés.



**Figure IV-8.** Spectrogrammes RMN du  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) des composés carbonés solubles acquis lors de l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose (5 mM) par *L. bicolor*. Les extraits mycéliens proviennent de (A) 0,037 g (masse sèche) ou (B) 0,038g (masse sèche) de mycelium. Les mycelia ont été cultivés pendant 5 semaines sur milieu de Pachlewski P5 (110 mM glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ), puis placés pendant 48 h sur un milieu de Pachlewski modifié (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) avant d'être cultivés pendant **12 h** sur le milieu de marquage additionné de PEG en concentration croissante, induisant des potentiels hydriques de -0,42 (A) et -0,59 MPa (B). Après extraction, les composés carbonés solubles ont été dissouts dans une solution aqueuse 10 mM d'acide ethylenediaminetétraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbone du tréhalose (T), de la glutamine (Gln).



**Figure IV-9.** Spectrogrammes RMN du  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) des composés solubles de *L. bicolor* acquis lors de l'assimilation de  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose (5 mM). Les extraits mycéliens proviennent de (A) 0,028 g (masse sèche) ou (B) 0,056g (masse sèche) de mycelium. Les mycelia ont été cultivés pendant 5 semaines sur milieu de Pachlewski P5 (110 mM glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ), puis placés pendant 48 h sur un milieu de Pachlewski modifié (20 mM de glucose, 7mM  $\text{NH}_4^+$ ) avant d'être cultivés pendant **36 h** sur un milieu de marquage additionné de PEG en concentration croissante, induisant des potentiels hydriques de - 0,42 (A) et -0,59 MPa (B). Les extraits mycéliens ont été dissouts dans une solution aqueuse 10 mM d'acide ethylenediaminetétraacétique (EDTA) (pH 7,0). Les signaux correspondant aux différents carbone du tréhalose (T), de la glutamine (Gln) sont représentés.

**A****-0,42 MPa****36 h****[1-<sup>13</sup>C]glucose****B****-0,59 MPa****36 h****[1-<sup>13</sup>C]glucose**

***Troisième Volet : biodiversité fonctionnelle des populations de *Cenococcum geophilum* au sein de la hêtraie Lorraine.***

## Chapitre V

---

**Activités respiratoires d'isolats mycéliens de *Cenococcum geophilum* après induction d'un stress hydrique**

---

## Introduction

Plusieurs auteurs ont noté les grandes capacités de résistance au stress hydrique de *C. geophilum* par rapport aux autres champignons ectomycorhiziens testés (Mexal and Reid, 1973 ; Coleman *et al.*, 1989 ; Neves Machado, 1995). Ces mêmes auteurs ont par ailleurs souligné une forte variabilité dans la réponse de *C. geophilum* selon l'isolat testé.

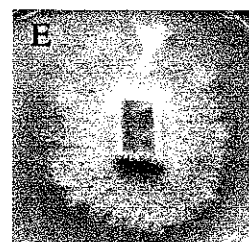
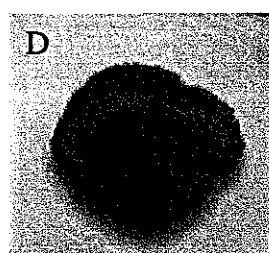
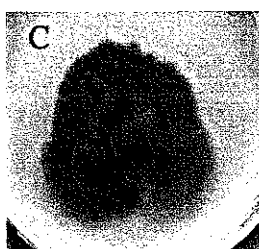
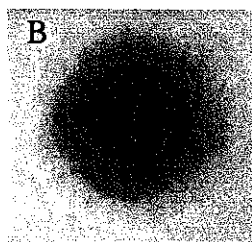
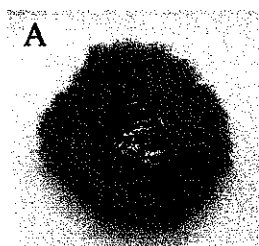
L'existence d'une variabilité intra-spécifique dans la réponse physiologique des champignons ectomycorhiziens est évidente (Cairney, 1999). Cependant peu d'études comparant, pour un critère physiologique donné, un nombre important d'isolats d'une même espèce ont été menées. La plupart des travaux ont été effectués sur moins de cinq isolats (Cairney, 1999), et ne mettent pas en évidence un lien entre diversité génétique et variabilité fonctionnelle. Citons toutefois Colpaert *et al.* (2000) qui ont comparé la tolérance aux métaux de 20 isolats de *Suillus luteus* issus de deux populations parfaitement caractérisées au niveau génétique. Ce type d'étude ne peut pas être mené directement sur les ectomycorhizes mais sur des cultures axéniques, dont on évalue généralement (comme dans Colpaert *et al.*, 2000) la croissance ou la production de biomasse comme indicateurs de "fitness", après les avoir soumises à une condition donnée (culture en conditions de stress croissant par exemple).

En considérant les résultats de Coleman *et al.* (1989) ou de Neves Machado (1995) qui ont observé sur un petit nombre d'isolats que la résistance au stress hydrique de *C. geophilum* dépendait de l'isolat testé, il apparaît fort possible que l'activité des ectomycorhizes de *C. geophilum* au sein de la hêtraie lorraine (testée dans le chapitre III) soit dépendante du génotype du champignon. La grande diversité génétique que nous avons mise en évidence chez *C. geophilum* au sein de la hêtraie lorraine (Jany *et al.*, 2002) pourrait alors expliquer en partie la forte variabilité observée dans le fonctionnement en condition de bas potentiel hydrique du sol des ectomycorhizes de *C. geophilum* associé au hêtre en Lorraine.

Afin d'appréhender un tel lien, nous avons tenté d'appliquer les tests de radiorespirométrie (préalablement effectués sur les ectomycorhizes de *C. geophilum*, Cf. Chapitre III) aux différents isolats de *C. geophilum* caractérisés dans Jany *et al.* (2002) afin d'évaluer leur activité physiologique après les avoir soumis à un stress desséchant.

**Tableau V-1.** Origine et type ITS des isolats de *C. geophilum* testés.

| Isolat | Origine                                       | Ribotype (Jany et al, 2002) |
|--------|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| 147-54 | ectomycorhize (/ epicéa) (Suède)              | A <sub>c</sub>              |
| Td31   | sclérote (Tendon, hêtraie lorraine, France)   | A <sub>c</sub>              |
| Am51   | sclérote (Amance, hêtraie lorraine, France)   | B <sub>c</sub>              |
| Cre41  | sclérote (La Crête, hêtraie lorraine, France) | B <sub>c</sub>              |



**Fig. V-1.** Isolats de *C. geophilum*: 147-54 (A) (Suède), Td31 (B), Am51 (C), Cre41(D) (lorraine , France) et isolat de *L. bicolor* S238N (E).

## Matériels et Méthodes

### *Isolats fongiques*

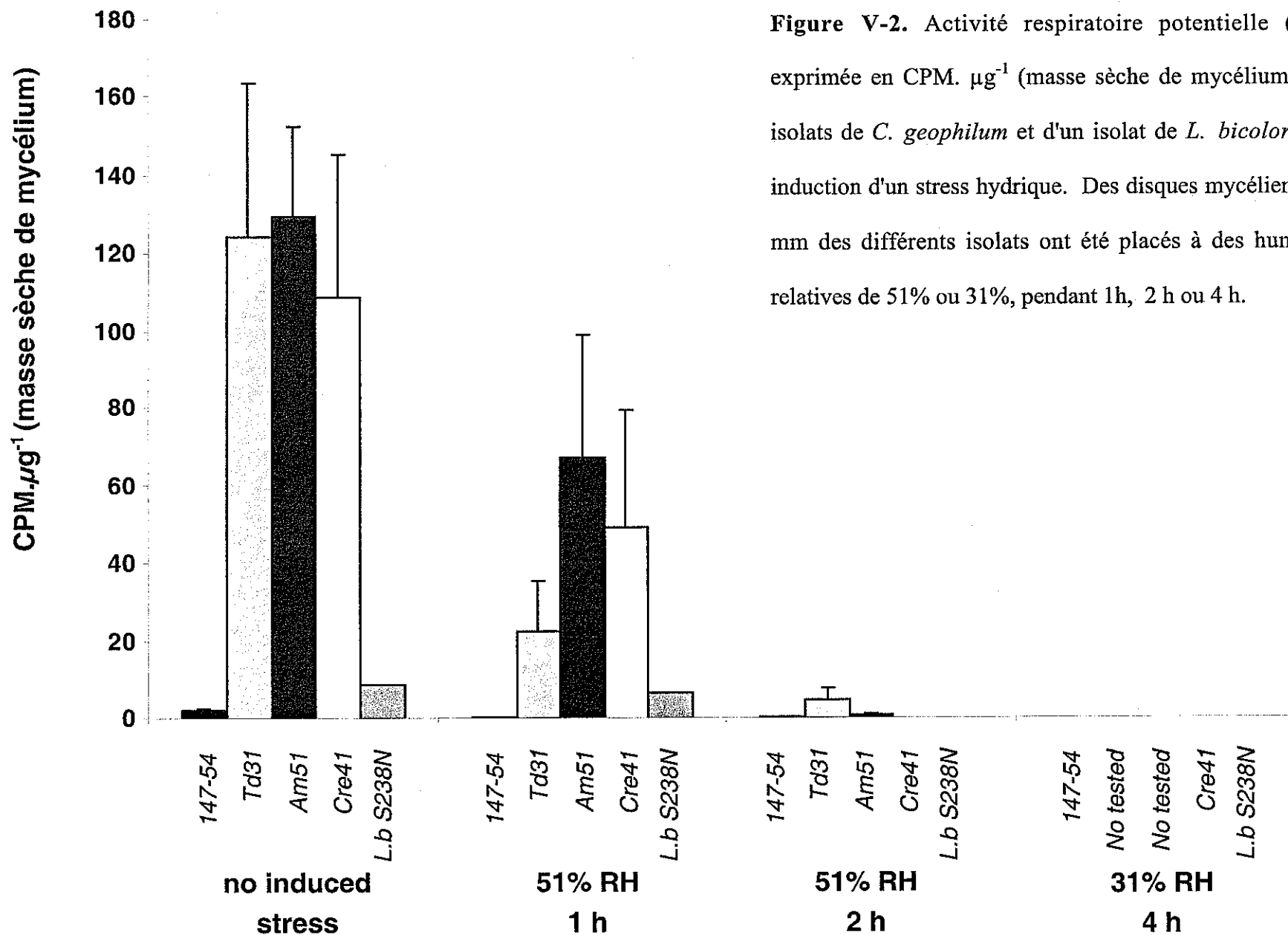
Pour *C. geophilum* nous avons retenu l'isolat 147.54 isolé à partir d'ectomycorhizes d'*Epicea* récoltées en Suède (Centraal Bureau voor Schimmelcultures, The Netherlands) ainsi que l'ensemble des isolats dérivant de la mise en culture de sclérotés prélevés dans la hêtraie lorraine, dont le génotypes a été déterminé dans Jany *et al.* (2002). Parmi ces isolats, trois seulement ont pu *in fine* être testés : Am5.1, Cre4.1 et Td3.1. Deux des isolats de *C. geophilum* (147-54 et Td3.1) correspondent à un premier ribotype ( $A_c$ ), alors que les deux autres (Am 5.1 et Cre4.1) correspondent à un second ribotype ( $B_c$ ) (Tableau V-1). En plus nous avons testé l'isolat S238N de *Laccaria bicolor*. Les cinq isolats testés sont présentés sur la Fig. V-1. Les différents isolats ont été cultivés sur un milieu MEA2% (agar malté 2%) à l'obscurité et à 25°C.

### *Culture des différents isolats*

Les différents isolats ont été maintenus en culture en conditions stérile en boîte de Petri sur milieu MEA2% surmonté d'un feuillet de cellophane. Le feuillet de cellophane permet en effet de récupérer après développement de la colonie fongique, des fragments de mycélium pur sans milieu gélosé. Ainsi, les tests physiologiques ont été effectués à partir de disques découpés dans la frange de colonies fongiques âgées de 6 à 8 semaines (disques de cellophane surmontés du mycélium fongique).

### *Induction du stress hydrique*

L'induction du stress a été réalisée en maintenant l'atmosphère de la boîte de culture en équilibre avec une solution saline sursaturée de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ou de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  disposée dans un compartiment d'une boîte de Petri bi-compartimentée, amenant respectivement l'humidité relative dans la boîte de Petri à 31% et 51%. Des disques de 7 mm de mycélium en culture pure sur milieu MEA 2% ont été disposés dans le second compartiment de la boîte de Petri bi-compartimentée qui a été hermétiquement scellée. Les disques ont été maintenus dans cette atmosphère pendant 1h, 2h ou 4 h. Pour chaque isolat et pour chacune des conditions 4 disques ont été testés (4 répétitions).



**Figure V-2.** Activité respiratoire potentielle (PRA) exprimée en CPM.  $\mu\text{g}^{-1}$  (masse sèche de mycélium) de 4 isolats de *C. geophilum* et d'un isolat de *L. bicolor* après induction d'un stress hydrique. Des disques mycéliens de 7 mm des différents isolats ont été placés à des humidités relatives de 51% ou 31%, pendant 1h, 2 h ou 4 h.

### *Test radiorespirométrique*

Nous avons utilisé le protocole de micro-radiorespirométrie décrit par Al Abras *et al*, (1988) et adapté par nos soins. Ce protocole est décrit dans le chapitre III.

### *Mesure de la masse sèche des disques mycéliens*

Après le test radiorespirométrique, les disques de mycélium ont été séchés dans une étuve à 37°C puis stockés avant pesée dans une boîte de Petri contenant du Silicagel. Les pesées ont été réalisées à l'aide d'une balance de précision  $10^{-7}$  g (Mettler Toledo, Viroflay, France). L'activité respiratoire potentielle de chaque échantillon, exprimée en CPM, a été ramenée spécifiquement à la masse sèche de chacun des disques mycéliens.

## **Résultats**

### *Activités respiratoires des différents isolats*

Seuls trois isolats de *C. geophilum* (Am5.1, Cre4.1 et Td3.1) caractérisés génétiquement dans Jany *et al*. (2002) ont pu être testés. En effet, les autres isolats n'ont pas eu une croissance suffisante et/ou, après qu'ils aient digéré la feuille de cellophane, se sont développés à l'intérieur du milieu gélosé. Dans les deux cas, des disques de mycélium n'ont pu être découpés et soumis aux protocoles d'induction du stress desséchant et de radiorespirométrie.

Les différentes souches testées possèdent des niveaux d'activités respiratoires très différents (Fig. V-2). Il existe donc une forte variabilité inter-isolats. Les trois isolats de *C. geophilum* dérivant de mise en culture de sclérotés récoltés dans la hêtraie lorraine présentent des activités respiratoires (rapportées à la masse sèche des disques de mycélium) assez similaires. Elles varient  $100 \text{ CPM} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  à  $130 \text{ CPM} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ . Par contre, l'isolat 147-54 originaire de Suède et isolé à partir de racines d'Épicéa arbore une activité respiratoire environ 100 fois inférieure qui est même plus faible que celle enregistrée avec l'isolat de *Laccaria bicolor* qui avoisine  $10 \text{ CPM} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ .

### *Evolution de l'activité respiratoire en réponse à un stress hydrique*

Quelle que soit l'espèce ou l'isolat testé, l'activité respiratoire diminue lorsque le disque mycélien testé a été soumis à un stress hydrique desséchant. La diminution de l'activité respiratoire est liée à l'intensité du stress. Dès le premier niveau de stress (1h à 51% HR), l'isolat Am 5.1 le moins

affecté des isolats testés, possède une activité respiratoire diminuée de près de 50% par rapport au témoin sans stress induit. Après 2h à 51% HR, l'activité respiratoire des différents isolats est au minimum diminuée de plus de 80%.

Concernant les isolats de *C. geophilum* les valeurs d'activités respiratoires sont toujours beaucoup plus faibles dans le cas de l'isolat 147-45. Si l'on regarde les diminutions d'activités respiratoires, après 1 h à 51% HR, les isolats Am 5.1 et Cre 4.1 partageant le même ribotype B<sub>c</sub>, semblent moins affectés que les isolats Td 3.1 et 147-54 de ribotype A<sub>c</sub>. Cependant devant le faible nombre d'échantillons testés, aucune étude statistique n'a pu être réalisée.

## Discussion

Le faible nombre d'isolats de *C. geophilum* testés, alors que nous voulions utiliser l'ensemble des souches caractérisées génétiquement dans Jany *et al.* (2002) n'a pas autorisé l'atteinte des objectifs fixés, à savoir évaluer la variabilité dans la réponse au stress hydrique des différents géotypes de *C. geophilum* rencontrés dans la hêtraie lorraine. Cet objectif ne pourra être atteint qu'après avoir reconsidéré le problème de la culture des différents isolats de *C. geophilum* avant les tests physiologiques.

Dans le cas de *C. geophilum*, nos résultats suggèrent cependant une variabilité intra-spécifique puisque l'isolat 147-54 possède une activité respiratoire très inférieure à celle des autres isolats. Par contre, le niveau d'activité respiratoire en l'absence de stress, ne semble pas corrélé au type ITS. En effet, Td3.1 de ribotype A<sub>c</sub> possède une activité respiratoire similaire à celles de Am5.1 et Cre4.1 de ribotype B<sub>c</sub>, mais très supérieure à celle de l'isolat 147-54, pourtant lui aussi de ribotype A<sub>c</sub>. L'isolat 147-54 provenant d'une pessière suédoise alors que les autres isolats dérivent de sclérotés de la hêtraie lorraine, l'origine écogéographique pourrait expliquer la variabilité observée entre isolats de *C. geophilum*. Il faut noter toutefois que les différences écogéographiques intra-régionales existant entre les trois sites dont sont originaires les isolats Td3.1, Am5.1 et Cre4.1 ne sont pas liés à des différences d'activités respiratoires. Les faibles valeurs d'activités respiratoires de l'isolat 147-54 testé ici pourrait alors émaner de "l'historique" de la souche faite de multiples repiquages et conservations dans la mycothèque du laboratoire de l'U.M.R. IaM. De ce maintien *in vitro* durant plusieurs années pourrait résulter un phénomène d'adaptation. Par exemple, chez les champignons pathogènes, la pathogénicité est souvent modifiée suite aux différentes phases de la culture *in vitro* (Frey, communication personnelle).

Dans tous les cas, le stress hydrique a affecté de manière négative l'activité respiratoire des disques mycéliens. Cette diminution de l'activité respiratoire révélerait l'altération de l'état physiologique du champignon testé. La réponse des *C. geophilum* testés au stress dit desséchant n'apparaît pas meilleure que celle de *L. bicolor* comme pourrait le suggérer le caractère reconnu de *C. geophilum* de résistance au stress hydrique. Il s'agit cependant de noter que les différents travaux de Coleman *et al.* (1989) ou de Neves Machado (1995) ont mis en avant de grosses différences de comportement entre isolats de *C. geophilum*. Encore une fois, il convient dès lors de tester un nombre plus important d'isolats émanant de la hêtraie lorraine.

# **Discussion Générale**

## **Comprendre le fonctionnement d'une communauté ou d'une population de champignons ectomycorhiziens : une tâche difficile.**

Comme nous l'avions souligné dans l'**Introduction Générale**, parce qu'elles sont à l'interface sol-végétaux et qu'elles sont largement impliquées dans la nutrition hydrominérale des arbres, les symbioses ectomycorhiziennes jouent un rôle primordial dans le fonctionnement global des écosystèmes forestiers (Smith and Read, 1997). Depuis Frank (1885) et la découverte des mycorhizes, l'établissement et le fonctionnement de la symbiose (Martin, 2001) mais aussi l'autécologie de nombreuses espèces ont été largement décrits (Dahlberg, 2001). Par contre, la dynamique et les rôles écologiques joués globalement par les populations ectomycorhiziennes sont mal appréhendés et constituent une 'boîte noire' (Allen, 1991 *in* Horton et Bruns, 2001) mal identifiée par les mycorhizologues.

Analyser cette "boîte noire" est un défi qui s'avère difficile à plus d'un titre. En premier lieu, comprendre la dynamique et le fonctionnement des communautés ectomycorhiziennes, c'est établir un lien entre diversités génétique et fonctionnelle. C'est à dire idéalement, identifier tous les individus du cortège ectomycorhizien et comprendre comment ils fonctionnent, dans l'ensemble des conditions offertes par l'écosystème. Or, malgré l'utilisation de plus en plus aisée des techniques de typage moléculaire (Dahlberg, 2001), il reste encore impossible d'identifier tous les individus d'un cortège ectomycorhizien, en particulier pour certains genres ou espèces encore méconnus (Horton et Bruns, 2001). En plus, étudier globalement la fonction des milliers de gènes et protéines des champignons ectomycorhiziens reste, même aujourd'hui avec l'avènement de la génomique fonctionnelle (voir Martin, 2001), irréalisable à court terme. A l'heure actuelle, les études écologiques ne révèlent qu'imparfaitement la dynamique des groupements fonctionnels des organismes forestiers, dont la plasticité dépend grandement de la biodiversité (Loreau *et al.*, 2001). On comprend dès lors l'ampleur du travail restant à réaliser

Lors de notre étude des populations de *C. geophilum* dans la hêtraie lorraine, nous nous sommes donc heurtés à l'ensemble des ces difficultés expérimentales, et un œil critique découvrira que nous n'avons établi que peu de liens entre la diversité génétique et la physiologie du champignon ectomycorhizien *C. geophilum*. Toutefois notre étude apporte des précisions importantes (i) sur la structure génétique de *C. geophilum* à une échelle régionale et locale, et (ii) sur l'état physiologique des ectomycorhizes de *C. geophilum* en fonction des conditions environnementales ; c'est à dire sur l'aptitude de *C. geophilum* à prendre une part importante à la dynamique des groupes fonctionnels (Loreau *et al.*, 2001).

### Qu'est ce qu'une ectomycorhize de *C. geophilum* ?

Il peut sembler paradoxal de découvrir cette interrogation au niveau de la Discussion Générale. Nous avons, en introduction, défini une ectomycorhize comme une association symbiotique bi-partite entre un champignon ectomycorhizien et un hôte végétal. Cependant, au regard de notre expérience, cette définition apparaît trop simpliste. En effet, les travaux décrits dans le **Chapitre I** montrent que l'entité ectomycorhizienne *C. geophilum* est plus complexe : nous avons mis en évidence au niveau des ectomycorhizes de *C. geophilum*, la présence d'un champignon tiers que nous avons, par analyse des séquences, défini comme affine aux genres *Phialophora* et *Hymenoscyphus* (Fig.I-2). Les travaux de Wilcox et Wang (1987 a,b) ou ceux de Vralstad *et al.* (2002) démontrent qu'au moins trois espèces : *Chloridium paucisporum* et justement *Phialophora finlandia* et *Hymenoscyphus ericae* peuvent, associés à certains hôtes et dans certaines conditions, former des ectomycorhizes très proches morphologiquement de *C. geophilum*. Cependant sur les sites que nous avons étudiés, les analyses moléculaires décrites dans le **Chapitre II**, démontrent qu'un minimum de 80% des ectomycorhizes analysées sont bien des ectomycorhizes de *C. geophilum* (rien ne pouvant être conclu pour les 20% restant). De plus, lorsque nous avons identifié par PCR (amorces Kinha1 et Kinha2) la présence d'un champignon affine aux genres *Phialophora* et *Hymenoscyphus* dans l'extrait d'ADN d'une ectomycorhize, celle-ci était également colonisée par *C. geophilum* comme démontré par utilisation des amorces spécifiques CGITS1 et CGITS2. Il convient donc à ce stade d'admettre que certaines des ectomycorhizes noires attribuées à *C. geophilum* sont plus qu'une association bi-partite et qu'elles regroupent d'autres champignons, associés à ce dernier. Ce phénomène a déjà été observé par plusieurs auteurs pour d'autres espèces fongiques (Buscot, 1994 ; Jumpponen, 1998). L'utilisation de techniques d'hybridation *in situ* (technique FISH) associées à l'observation au microscope confocal permettrait de conclure quant à la nature de l'interaction entre ces champignons. En plus, l'ectomycorhize implique vraisemblablement d'autres organismes comme des bactéries présentes dans la rhizosphère pouvant jouer un rôle dans la formation et dans le fonctionnement de l'ectomycorhize (bactéries auxiliaires de la mycorhization ou BAM) (Duponnois et Garbaye; 1991 ; Duponnois, 1992 ; Brulé, 2001), voire au sein même des hyphes (bactéries intra-fongiques) comme cela semble être le cas chez *Laccaria bicolor* (Frey-Klett *et al.*, 2001 ; Bertaux, 2002) ou *Tuber Borchii* (Barbieri *et al.*, 2000).

## Caractérisation génétique des populations de Cenococcum geophilum au sein de la hêtraie

### Lorraine

*Dans la hêtraie lorraine les populations de C. geophilum possèdent une forte variabilité génétique (Cf. Chapitre II).*

En combinant l'utilisation de RAPD, de PCR/RFLP ciblant l'ITS (*CGITS*) de l'ADN ribosomique nucléaire, et de séquençage d'une région SCAR (*SCAR1*) détectée initialement par RAPD, nous avons mis en évidence une forte variabilité génétique chez *C. geophilum* échantillonné au sein de cinq placettes disposées dans des hêtraies adultes de la région lorraine (42 isolats provenant de la mise en culture de sclérotés de *C. geophilum* prélevés au sein des cinq placettes analysées). Nous avons calculé un indice de variabilité *PD* de 0,57 ce qui rapproche davantage *C. geophilum* de champignons ectomycorhiziens se développant majoritairement via la production de spores plutôt que de champignons se développant essentiellement par croissance végétative de leur mycélium.

Nous avons ensuite étudié la diversité génétique de *C. geophilum* directement au niveau de l'entité symbiotique : l'ectomycorhize, celle-là même qui jouerait un rôle fondamental dans la nutrition, mais aussi dans la résistance au stress hydrique des hêtres de la forêt lorraine. Nous n'avons pas pu utiliser les méthodes les plus discriminantes comme la RAPD, en raison de la présence au sein de la mycorhize du génome de l'hôte végétal. Nous avons alors utilisé la technique de PCR/RFLP sur les extraits d'ADN provenant des ectomycorhizes. En ciblant deux loci : l'ITS de l'ADN ribosomique nucléaire et une région SCAR (*SCAR1*), nous avons détecté au niveau régional un minimum de cinq génotypes, et nous avons montré que plusieurs génotypes différents pouvaient coexister au sein d'un volume de sol de l'ordre du dm<sup>3</sup>.

### *D'où peut émaner la forte diversité génétique de C. geophilum ?*

Dans le **Chapitre II**, nous ne livrons pas de réponses concernant le déterminisme de la forte variabilité génétique observée, car nous manquons encore d'outils d'investigation.

L'existence d'une forme sexuée cryptique de *C. geophilum* a déjà été suggérée. Dès les années 1800, le genre *Elaphomyces* (un Ascomycète hypogé plus récemment classé par Trappe, 1979 dans les Elaphomycétales) était soupçonné de constituer la forme sexuée de *C. gophilum* (in LoBuglio *et al.*, 1996). En effet l'existence d'une forme sexuée (téléomorphe) cryptique dont *C. geophilum* serait la forme imparfaite (anamorphe) pourrait expliquer la grande diversité génétique observée qui émanerait alors de recombinaisons méiotiques. LoBuglio *et al.* (1996) ont cependant

démontré sur la base d'une étude phylogénétique qu'*Elaphomyces* et *Cenococcum* étaient éloignés phylogénétiquement l'un de l'autre, classant *C. geophilum* dans les Loculoascomycètes.

Il faut noter que l'inexistence de sexualité ne signifie pas l'absence de diversité génétique. L'accumulation de mutations peut conduire à des populations fort diverses, cependant le phénomène de *Muller's ratchet* (que nous pourrions traduire par l'engrenage de Muller) (Muller, 1964 in Bidochka et De Koning, 2001) conduit peu à peu par le biais d'accumulation de mutations délétères à une réduction de la "*Fitness*" pouvant aller jusqu'à l'extinction de l'espèce. Selon les théories de l'évolution, l'existence de vieilles lignées véritablement asexuées est impossible. Toutefois, plusieurs études montrent que de telles lignées existent : cela semble être le cas chez des rotifères (Welch et Meselson, 2000), chez des champignons deutéromycètes (Bidochka et De Koning, 2001), et chez les champignons endomycorhiziens à arbuscules (Kuhn *et al.*, 2001). Chez ces derniers, la variabilité génétique existant au sein de différents noyaux co-existant au sein d'un même individu (une spore) semble provenir essentiellement de l'accumulation de mutations, avec éventuellement quelques rares événements de recombinaisons parasexuelles (fusions de noyaux différents, facilitées par l'état coenocytique de ces champignons endomycorhiziens).

La parasexualité peut également contribuer à l'apparition d'une forte diversité génétique, bien que son importance en conditions naturelles soit toujours contestée et que l'existence de l'incompatibilité somatique (phénomène fréquent chez les champignons ectomycorhiziens et qui existe chez *C. geophilum* d'après Diez, 1998) soit une limite à l'anastomose nécessaire à la parasexualité. Ce phénomène implique en effet une fusion d'hyphes (anastomose) suivie d'une hétérokaryose. Après la fusion des noyaux, des événements de *crossing-over* mitotiques suivis d'une haploïdisation par ségrégation de chromosomes permettant un retour à la ploïdie initiale aboutissent à une recombinaison non méiotique (Anderson et Kohn, 1998). Ces phénomènes permettraient notamment de créer de la diversité génétique chez de nombreux champignons pathogènes (Taylor *et al.*, 1999) comme révélé chez *Coccidioides immitis* (Burt *et al.*, 1996).

L'intervention de recombinaisons méiotiques ou parasexuelles qui peut être à l'origine de la variabilité génétique observée chez *C. geophilum* peut être testée selon plusieurs méthodes, toutes basées sur l'analyse de la variation génétique entre individus d'une population (Taylor *et al.*, 1999). La plus utilisée repose sur l'estimation des liaisons existant entre allèles des différents loci. En effet, en l'absence de recombinaison génétique, il existe des liaisons entre allèles de différents loci. Au contraire, en cas de recombinaison, toutes les combinaisons alléliques

possibles sont observées pour une paire de loci donnée (absence de déséquilibre de liaisons). En théorie, disposer de deux loci bi-alléliques suffit à estimer le niveau de déséquilibre de liaison, mais un génotypage dit 'multilocus' est préférable. Les liaisons entre loci peuvent être estimées via l'utilisation des index d'association ( $I_A$ ). Le principe de base repose sur le calcul des distances entre génotypes 'multilocus' de chacune des paires d'individus de la population et sur celui des variances de ces distances. S'il existe une recombinaison génétique, la distribution des distances doit être normale (avec peu d'individus très proches génétiquement et très peu d'individus éloignés), et la variance de ces distances (dont dérive l'index d'association  $I_A$ ) doit être faible. L'utilisation chez *C. geophilum* de plusieurs marqueurs SCAR comme *SCAR1* (décrit dans le **Chapitre II**) pourrait ainsi permettre l'élaboration d'un génotypage 'multilocus' utilisable pour le calcul des index d'association. Mais pour cela, il s'avère nécessaire de développer un ensemble de marqueurs du type de *SCAR1*.

*Les populations de C. geophilum semblent différenciées spatialement.*

Nous avons montré que les populations de *C. geophilum* étaient différentes selon la placette d'origine. Nous suggérons l'impact de la séparation géographique ou bien celui des caractères écologiques de chacune des placettes dans la structuration génétique de cette espèce. Nous avons même plus spécifiquement noté que les populations de *C. geophilum* (lorsque celui-ci est impliqué dans la formation de mycorhizes) étaient différentes selon leur placette d'origine. Ainsi, les génotypes majoritairement rencontrés dans les sols les plus acides de l'étude (Tendon, Hennezel et Charmois) diffèrent de ceux rencontrés dans les sols moins acides (Amance) ou celui basique et calcaire (La Crête). Les caractères écologiques, et plus particulièrement édaphiques, semblent ainsi être impliqués dans la structuration génétique observée. La sélection par des facteurs édaphiques de génotypes les plus adaptés est reconnue (Ennos et Mc Connell, 1995). Panaccione *et al.* (2001) ont d'ailleurs suggéré que ce type de sélection pouvait être appliquée sur des populations de *C. geophilum*. Cependant, dans ce dernier cas, tout comme dans celui de notre étude, les marqueurs utilisés sont considérés comme des marqueurs neutres qui selon toute vraisemblance ne sont pas soumis à sélection. Ces marqueurs pourraient toutefois être liés à des loci soumis à sélection.

D'autres facteurs pouvant intervenir dans la structuration des populations lorraines de *C. geophilum* sont discutés dans notre publication. Notamment la séparation par la distance géographique qui pourrait jouer un rôle important. Cette hypothèse est en accord avec les

résultats d'un test de Mantel réalisé à partir des données obtenues par RAPD sur les isolats mycéliens. Elle apparaît plausible lorsque l'on sait que *C. geophilum* ne produit pas de spores aéroportées mais seulement des sclérotés inféodés au sol, réduisant ainsi les flux génétiques.

L'estimation des flux de gènes pourrait permettre d'estimer l'importance du facteur de séparation spatiale dans la structuration génétique observée au sein de la hêtraie lorraine. Cette estimation est généralement basée sur les calculs de statistiques dites  $F$  ou statistiques de Wright (Wright, 1943) qui comparent la fréquence des allèles au niveau de loci polymorphes (identiques à ceux utilisés pour le calcul des index d'association). Ces tests comparent la probabilité de trouver chez deux individus d'un même groupe des allèles identiques, à la probabilité de trouver des allèles identiques chez deux individus de groupes différents. Si le flux de gènes est important alors les deux probabilités doivent être comparables ( $F_{ST}$  proche de 0). Si le flux de gènes est faible entre les groupes, la première probabilité citée doit être supérieure à la seconde ( $F_{ST}$  proche de 1). En disposant (comme pour l'estimation des déséquilibres de liaison) d'un lot de marqueurs SCAR comme *SCAR1*, ces calculs statistiques pourront alors être effectués.

### **Caractérisation physiologique des populations de *Cenococcum geophilum* au sein de la hêtraie Lorraine, résistance au stress hydrique.**

Il est largement reconnu que *C. geophilum* présente par rapport aux autres champignons ectomycorhiziens une grande résistance au stress hydrique (Mexal and Reid, 1973; Coleman *et al.*, 1989; Neves Machado, 1995). Le déterminisme de cette résistance isolat-dépendante (Coleman *et al.*, 1989) n'est pas encore connu. Nous n'avons pas réussi dans le **Chapitre IV** à mettre en évidence des processus d'osmorégulation ou d'osmoprotection se traduisant par l'accumulation de composés carbonés (mannitol, tréhalose, proline) lorsque nous avons caractérisé le catabolisme du [ $^{13}\text{C}$ ]glucose chez *C. geophilum*. Nous avons discuté du rôle hypothétique joué par les mélanines fongiques présentes dans les parois épaisses de *C. geophilum*. Les mélanines sont susceptibles d'apporter une résistance "physique" (Bell et Wheeler, 1986 ; Butler *et al.*, 2001).

Dans le cadre de ce travail, nous avons vérifié dans le **Chapitre III** qu'en conditions de bas potentiel hydrique *in situ*, *C. geophilum* maintenait mieux que le morphotype dominant (type *Lactarius*), l'activité physiologique (activité respiratoire potentielle) des racines de hêtre. Cela est en accord avec l'hypothèse de Pigott (1982 a,b), selon laquelle les ectomycorhizes de *C. geophilum* conserveraient intactes, même en cas de forts stress hydriques, leurs capacités

physiologiques optimales. Cette propriété leur permettrait ainsi, de suite après la période de sécheresse, d'absorber l'eau à nouveau disponible, conférant ainsi un avantage aux racines colonisées par *C. geophilum*. D'après nos résultats, il semblerait que les différences d'activités physiologiques entre *C. geophilum* et le type *Lactarius* soient plus prononcées au sein de deux sites (La Crête et Amance). Au sein de ces deux placettes, les ectomycorhizes de *C. geophilum* échantillonnées impliquent uniquement le ribotype B<sub>c</sub> de *C. geophilum* (génotypes A et C in Jany *et al.*, 2002). Sur l'ensemble des autres sites où la différence d'activités respiratoires entre ectomycorhizes de *C. geophilum* et du type *Lactarius* n'est pas significative, le ribotype Ac est également quantitativement important (Charmois) ou très largement dominant (Hennezel et Tendon). Ce résultat suggère un lien possible entre les caractéristiques génétiques de *C. geophilum* et l'activité physiologique de ses ectomycorhizes. La suite logique à donner à ce travail était de réaliser des tests physiologiques sur l'ensemble des 42 isolats de *C. geophilum* que nous avons génotypés (Jany *et al.*, 2002). En raison d'un protocole de culture initiale mal adapté, nous n'avons mesuré l'activité respiratoire potentielle après induction d'un stress hydrique (dans le **Chapitre V**), que pour trois isolats lorrains seulement. Ces données apparaissent très insuffisantes à toute étude de la diversité de la réponse physiologique des différents génotypes de *C. geophilum* détectés dans la hêtraie lorraine. Cet échec livre comme perspective immédiate, l'utilisation lors de l'induction du stress, d'un système de culture sur une membrane (séparant le mycélium du milieu contenant le polyéthylèneglycol) différente de la cellophane et non dégradable par *C. geophilum*.

### **Comment obtenir davantage d'informations sur la fonction et la dynamique des ectomycorhizes de *C. geophilum* ?**

Notre étude informe sur l'état physiologique des racines ectomycorhizées par *C. geophilum*, sur la comparaison de *C. geophilum* avec un autre symbiote ectomycorhizien, et sur d'éventuels liens entre structure génétique et physiologie. Il serait souhaitable d'arriver à obtenir une information plus riche sur la fonction des ectomycorhizes et, idéalement, de la relier systématiquement à la structure génétique. Les outils utilisés actuellement ne permettent malheureusement pas d'apporter ce type de réponse, mais les programmes de génomique fonctionnelle développés activement par plusieurs équipes (en particulier celle où la présente étude a été initiée), devraient autoriser à court terme une description de la diversité génétique et physiologique des différents génotypes d'une population et d'une communauté de champignons ectomycorhiziens. Ceci

permettrait d'identifier et de caractériser la plasticité génétique assurant les ajustements physiologiques des populations. Dans notre cas, il s'agirait en utilisant un ou des marqueurs du type SCAR (tel que *SCAR1* qui est fortement polymorphe) de typer génétiquement les ectomycorhizes de *C. geophilum*. A partir de chacune des ectomycorhizes analysées devrait être extraits les ARN alors hybridés à des milliers d'ADNc présents sur des filtres d'ADNc. A partir des profils d'hybridation, il serait alors possible de disposer de profils d'expression génique globaux et de mettre en évidence des groupes de gènes dont l'expression est coordonnée dans les différentes ectomycorhizes ou les différentes conditions de prélèvement (site, sol, climat...).

# **Bibliographie**

- Abuzinadah RA, Read DJ. 1986.** The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **103**: 481-493.
- Agerer R. 1991.** Characterization of ectomycorrhizas. *Methods in Microbiology* **23**: 21-30.
- Agerer R. 1995.** Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 687-734.
- Agerer RM. 1991.** Characterization of ectomycorrhizas. *Methods in microbiology* **23**: 21-30.
- AlAbrás K, Bilger I, Martin F, LeTacon F, Lapeyrie F. 1988.** Morphological and physiological changes in ectomycorrhizas of spruce [*Picea excelsa* (lam.) Link] associated with ageing. *New Phytologist* **110**: 535-540.
- Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G, Potenza L, Stocchi V. 1998.** Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Molecular Ecology* **7**: 273-278.
- Anderson CP, Markhart AH, Dixon RK, Sucoff EI. 1988.** Root hydraulic conductivity of vesicular arbuscular mycorrhizal green ash seedlings. *New Phytologist* **109**: 465-471.
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG. 1998.** Use of molecular methods to estimate the size and distribution of mycelial individuals of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Mycol Research* **102**: 295-300.
- Anderson JB, Kohn LM. 1998.** Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 444-449.
- Antibus RK, Croxdale JG, Miller OK, Linkins AE. 1981.** Ectomycorrhizal fungi of *Salix rotundifolia*. III. Resynthesized mycorrhizal complexes and their surface phosphatase activities. *Canadian Journal of Botany* **59**: 2458-2465.
- Antibus RK, Kroehler CJ, Linkins AE. 1986.** The effects of external pH, temperature, and substrate concentration on acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* **64**: 2383-2387.
- Antibus RK, Sinsabaugh RL, Linkins AE. 1992.** Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* **70**: 794-801.
- Augé RM. 2001.** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.
- Augé RM, Duan X. 1991.** Mycorrhizal and non-hydraulic root signals of soil drying. *Plant Physiology* **97**: 821-824.

- Augé RM, Schekel KA, Wample RL. 1986.** Osmotic adjustment in leaves of VA mycorrhizal and non mycorrhizal rose plants in response to drought stress. *Plant Physiology* **82**: 765-770.
- Augé RM, Schekel KA, Wample RL. 1987.** Leaf water and carbohydrate of VA mycorrhizal rose exposed to drought stress. *Plant and Soil* **99**: 291-302.
- Badeau V, Bréda N, Landmann G. 1997.** The recent crisis in beech vitality in lowland areas was seemingly mainly caused by water shortage. *Les cahiers du DSF 1-1997* (la santé des forêts [France] en 1996): 60-63.
- Bae KS, Barton L. 1989.** Alkaline phosphatase and other hydrolases produced by *Cenococcum graniforme*, an ectomycorrhizal fungus. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2511-2516.
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* **121**: 263-271.
- Barbieri E, Potenza L, Rossi I, Sisti D, Giomaro G, Rossetti S, Beinfohr C, Stocchi V. 2000.** Phylogenetic characterization and *in situ* detection of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. Ectomycorrhizal mycelium. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 5035-5042.
- Baxter JW, Dighton J. 2001.** Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host-symbiont culture conditions. *New Phytologist* **152**: 139-149.
- Bell AA, Wheeler MH. 1986.** Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 411-451.
- Bertaux J. 2001.** *Détection de bactéries intracellulaires dans le champignon ectomycorhizien Laccaria bicolor S238N*. DEA de Biologie Forestière, Université de Nancy.
- Bidochka MJ, De Koning J. 2001.** Are teleomorphs really necessary?: modelling the potential effects of Muller's Ratchet on deuteromycetous entomopathogenic fungi. *Mycological Research* **105**: 1014-1019.
- Blaise T, Garbaye J. 1983.** Effets de la fertilisation minérale sur les ectomycorhizes d'une hêtraie. *Acta Oecologica / Oecologia Plantarum* **18**: 165-169.
- Bonello P, Bruns TD, Gardes M. 1998.** Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytologist* **138**: 533-542.
- Bowen GD. 1973.** *Mineral nutrition of ectomycorrhiza*. In: *Ectomycorrhiza* (Eds. GC.Marks, TT Koklowski) Academic Press, London, New York.

- Brosnan JT. 1982.** Pathways of carbon flux in gluconeogenesis. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **41**: 91-95.
- Brown AD. 1990.** *Microbial water stress physiology - Principles and perspectives*. (Eds. J. Wiley and sons Ltd.) Chichester, UK, 313 p.
- Brulé C. 2001.** *Etude des interactions entre une bactérie auxiliaire de la mycorhization et un champignon ectomycorhizien*. Thèse de Doctorat de l'Université de Nancy I. 119 pp.
- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 1996.** Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **93**: 770-773.
- Buscot F. 1994.** Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr) Boudier with *Picea abies* (L.) Karst.. *Mycorrhiza* **4**: 223-232.
- Buscot F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U, Hampp R. 2000.** Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Review* **24**: 601-614.
- Bussell JD. 1999.** The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* **8**: 775-789.
- Butler MJ, Day AW. 1998.** Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **4**: 1115-1136.
- Butler MJ, Henson JM, Money NP. 2001.** Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia* **93**: 1-8.
- Cairney JWG. 1999.** Intraspecific physiological variation: implications for understanding functional diversity in ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **9**: 125-135.
- Cardoso MA, Provan J, Powell W, Ferreira PCG, De Oliveira DE. 1998.** High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* **7**: 601-608.
- Casgrain P, Legendre P. 2001.** The R package for multivariate and spatial analysis, version 4.0d3 - User's manual. Département des sciences biologiques, Université de Montréal. Available on WWW site <http://www.fas.umontreal.ca/BIOL/legendre/>.
- Clark AJ, Blissett KJ, Oliver RP. 2002.** Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyperosmotic stress and *in planta*. *Planta*, soumis.
- Cline ML, France RC, Reid CPP. 1987.** Intraspecific and interspecific variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. *Canadian Journal of Botany* **65**: 869-875.

- Coleman MD, Bledsoe CS, Smith BA. 1990.** Root hydraulic conductivity and xylem sap levels of zeatin riboside and abscisic acid in ectomycorrhizal Douglas fir seedlings. *New Phytologist* **115**: 275-284.
- Coleman MD, Bledsoe CS, Lopushinsky W. 1989.** Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Canadian Journal of Botany* **67**: 29-39.
- Colpaert JV, Van den Koornhuyse P, Adriaensen K, Van Gronsvelt JL. 2000.** Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytologist* **147**:367-379
- Corpet F. 1988.** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881-10890.
- Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE. 1997.** Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in South Sweden. *Canadian Journal of Botany* **75**: 1323-1335.
- Dahlberg A, Stenlid J. 1994.** Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L, Fr) Roussel revealed by somatic incompatibility. *New Phytologist* **128**: 225-234.
- Dahlberg A, Stenlid J. 1995.** Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* **73**: 1222-1230.
- Dahlberg A. 1997.** Population ecology of *Suillus variegatus* in old Swedish Scots pine forests. *Mycological Research* **101**: 47-54.
- Dahlberg A. 2001.** Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* **150**: 555-562
- Debaud JC, Marmeisse R, Gay G. 1995.** *Intraspecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi. In Mycorrhiza: structure molecular biology and function.* (Eds. AK Varma, B Hock) pp 79-113. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany:
- Den Hollander JA, Ugurbil K, Brown TR, Shulman RG. 1981.** Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochemistry* **20**: 5871-5880.
- Díez J, Anta B, Manjon JL, Honrubia M. 2001.** Genetic variability of *Pisolithus* isolates associated with native hosts and exotic eucalyptus in the western Mediterranean region. *New Phytologist* **149**: 577-587.
- Díez J. 1998.** *Micorrizas des bosque mediterraneo: reforestacion, biotecnologia forestal (micropropagacion y micorrizacion in vitro) y ecologia molecular.* PhD, Université d'Alcala (Espagne).

- Ditengou FA. 2000.** *Mise en évidence de l'antagonisme hypaphorine / AIA lors du développement de l'ectomycorhize Pisolithus tinctorius-Eucalyptus globulus.* Thèse de L'Université Henri Poincaré.
- Dixon RK, Rao MV, Garg VK. 1994.** Water relation and gas exchange of mycorrhizal *Leucaena leucocephala* iseedlings. *Journal of Tropical Forest Science* **6**: 542-552.
- Dosskey MG, Boersma L, Linderman RG. 1991.** Role of photosynthetate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas fir seedlings to drying soil. *New Phytologist* **117**: 327-334.
- Druger U, Shonbeck F. 1992.** Effect of vesicular arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, phoyosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *Plant Physiology* **141**: 40-48.
- Duan X, Neuman DS, Reiber JM, Green CD, Saxton AM, Augé RM. 1996.** Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors involved in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1541-1550.
- Duponnois R. 1992.** *Les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas (Pseudotsuga menziesii (Mirb.) (Franco) par Laccaria laccata souche S238.* Thèse de Doctorat de l'Université de Nancy I. 245 pp.
- Duponnois R, Garbaye J. 1991.** Effect of dual inoculation of Douglas fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorhization helper bacteria (MHB) in two bare-root forest nurseries. *Plant and Soil*. **138**: 169-176.
- Ellstrand NC, Roose ML. 1987.** Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**: 123-131.
- Ennos RA, McConnell KC. 1995.** Using genetic markers to investigate natural selection in fungal populations. *Canadian Journal of Botany* **73**: S302-S310.
- Farmer DJ, Sylvia M. 1998.** Variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of a diverse collection of ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* **102**: 859-865.
- Fiore-Donno AM, Martin F. 2001.** Genetic structure of populations of the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron* and *Xerocomus pruinatus* in an old mixed forest. *New Phytologist* **152**: 533-542.
- Fitter AH. 1988.** Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. *Journal of Experimental Botany* **3**: 595-603.
- Fox FM.. 1986.** Ultrastructure and infectivity of sclerotium-like bodies of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma sacchariolens* on birch (*Betula* spp.) *Transactions of the British Mycological Society* **87**: 359-369.

- Frank AB. 1885.** *Über die auf Wurzelsymbiose beruhende ernährung gewisser bäume durch unterirdische pilze.* *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **3**: 128-145.
- Frankland JC. 1998.** Fungal succession -unravelling the unpredictable. *Mycological Research* **102**: 1-15.
- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, Berge O, Heulin T. 1997.** Metabolic and genotyping fingerprinting of fluorescent pseudomonas associated with the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1852-1860.
- Frey-Klett P, Bertaux J, Brulé C, Churin JL, Hartmann Al, Gianinazzi-Pearson V, Hartmann, An, Garbaye J. 2001.** Searching for endocellular bacteria in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. 9th International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, Pays-Bas, 26-31 août 2001.
- Fritsch P, Rieseberg LH. 1996.** The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith TB, Wayne RK, eds. *Molecular genetic approaches in conservation*. New York, USA: Oxford Press University, 54-73.
- Garbaye J, Eltrop L, George E, Guehl JM, Vetterlein D, Wartinger A, Sun YP, Unestam T. 1993.** *Drought stress and ectomycorrhizas II- Plant water relations - Neuvième conférence nord-américaine sur les mycorrhizes*, Guelph, Ontario, Canada. P62
- Garbaye J, Guehl JM. 1997.** Le rôle des ectomycorhizes dans l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers. *Revue Forestière Française* **S49**: 110-120.
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW. 1991.** Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* **69**: 180-190.
- Gardes M, Bruns TD. 1996.** Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* **74**: 1572-1583.
- Garrett HE, Carney JL, Hedrick HG. 1982.** The effects of ozone and sulfur dioxide on respiration of ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forest Research* **12**: 141-145.
- Gehring CA, Theimer TC, Whitham TG, Keim P. 1998.** Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* **79**: 1562-1572.
- Genet P. 1999.** *Etude comparée et saisonnière de l'influence de deux champignons mycorrhiziens sur la nutrition minérale du hêtre dans deux sols forestiers naturels.* PhD thesis, Université de Nancy, France.

- Genetet I, Martin F, Stewart GR. 1984.** Nitrogen assimilation in mycorrhizas. Ammonium assimilation in the N-starved ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*. *Plant Physiology* **76**: 395-399.
- Gherbi H, Delaruelle C, Selosse MA, Martin F. 1999.** High diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology* **8**: 2003-2013.
- Goicoechea N, Dolezal K, Antolin MC, Strnad M, Sanchez-Diaz M. 1995.** Influence of mycorrhizae and *Rhizobium* on cytokinin content in drought-stressed alfalfa. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1543-1549.
- Greenville DJ, Peterson RL, Piché Y. 1985.** The development , structure, and histochemistry of sclerotia of ectomycorrhizal fungi. I. *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany* **63**: 1412-1417.
- Grime JP. 1977.** Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American naturalist* **111**: 1169-1194.
- Gryta H, Debaud JC, Marmeisse R. 2000.** Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding. *Heredity* **84**: 294-302.
- Guehl JM, Garbaye J. 1990.** The effect of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water-use efficiency and response to transplanting in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Annales des Sciences Forestières* **21**: 551-563.
- Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R. 2001.** Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology* **10**: 1121-1131.
- Hacskeylo E, Palmer JG, Vozzo JA. 1965.** Effect of temperature on growth and respiration of ectotrophic mycorrhizal fungi. *Mycologia* **57**: 748-756.
- Harley JL, Smith SE. 1983.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, UK.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 1998.** Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394** : 431.
- Hocking AD, Norton RS. 1983.** Natural-abundance <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies on the internal solutes of xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology* **129**: 2915-2925
- Horton TR, Bruns TD. 2001.** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box. *Molecular Ecology* **10**: 1855-1871.
- Huang J, Hsieh TF, Chastagner GA, Hsiang T. 2001.** Clonal and sexual propagation in *Botrytis elliptica*. *Mycological Research* **105**: 833-842.

- Hult K, Veide A, Gatenbeck S. 1980.** Production on NADPH in the mannitol cycle among fungal species. *Archives of Microbiology* **128**: 253-255.
- Hult KA, Gatenbeck S. 1978.** Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternata*. *European Journal of Biochemistry* **88**: 607-612.
- Ingleby K, Mason PA, Last FT, Fleming LV. 1990.** *Identification of ectomycorrhizas*. ITE research publication, Midlothian, Scotland. 112 p.
- Jany JL, Garbaye J, Martin F. 2002.** *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests (in press).
- Jenings DH, Burke RM. 1990.** Compatible solutes - the mycological dimension and their role as physiological buffering agent. *New Phytologist* **116**: 277-283.
- Jongmans AG, Van Breemen N., Lundström U, Van Hees PAW, Finlay RD, Srinivasan M, Unestam T, Giesler R, Melkerud PA, Olson M. 1997.** Rock eating fungi. *Nature* **389**: 351-352.
- Jonsson L, Anders D, Tor-Erik B. 2000.** Spatiotemporal distribution of an ectomycorrhizal community in an oligotrophic Swedish *Picea abies* forest subjected to experimental nitrogen addition: above- and below-ground views. *Forest Ecology and Management* **132**:143-156.
- Jonsson L, Dahlberg A, Nilsson MC, Zackrisson O, Kåren O. 1999a.** Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Molecular Ecology* **8**: 205-215.
- Jonsson L, Dahlberg A, Nilsson MC, Kåren O, Zackrisson O. 1999b.** Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytologist* **142**: 151-162.
- Jonsson T, Kokalj S, Finlay R, Erland S. 1999.** Ectomycorrhizal community structure in a limed spruce forest. *Mycological Research* **103**: 501-508.
- Jumpponen A, Mattson KG, Trappe JM. 1998.** Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* **7**: 261-265.
- Karabaghli C, Sotta B, Gay G. 1997.** Hormones fongiques, ectomycorhizes et rhizogenèse. Champignons et mycorhizes en forêt. *Revue Forestière Française* numéro special 1997: 110-120.

- Kåren O, Högborg N, Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE. 1997.** Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* **136**: 313-325.
- Kelly DJA, Budd K. 1991.** Polyol metabolism and osmotic adjustment in the mycelial ascomycete *Necosmospora vasinfecta* (E. F. Smith). *Experimental Biology* **15**: 55-64.
- Kikuchi K, Matsushita N, Guerin-Laguette A, Ohta A, Suzuki K. 2000.** Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. *Mycological Research* **104**: 1427-1430.
- Koide RT, Shumway DL, Stevens CM. 2000.** Soluble carbohydrates of red pine (*Pinus resinosa*) mycorrhizas and mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **104**: 834-840.
- Kothari SK, Marschner H, George E. 1990.** Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytologist* **116**: 303-311.
- Kranabetter JM, Wylie T. 1998.** Ectomycorrhizal community structure across forest openings on naturally regenerated western hemlock seedlings. *Canadian Journal of Botany* **76**: 189-196.
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR. 2001.** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **411**: 745-748.
- Kulkarni RK. 1990.** Mannitol metabolism in *Lentinus edodes*, the Shiitake mushroom. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 250-253.
- Last FT, Dighton J, Mason PA. 1987.** Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* **2**: 157-161.
- Le Tacon F, Selosse MA. 1994.** La place des symbioses mycorrhiziennes dans l'évolution de la vie. *Acta Botanica Gallica* **141**: 405-419.
- Leake JR 2001.** Is diversity of ectomycorrhizal fungi important for ecosystem function? *New Phytologist* **152**: 1-8.
- LePage BA, Currah RS, Stockey RA, Rothwell GW. 1997.** Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. *American Journal of Botany* **84**: 410-412.
- Lewontin RC. 1972.** The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* **6**: 381-398.
- Lilleskov EA, Bruns TD. 2001.** Nitrogen and ectomycorrhizal fungal communities: what we know, what we need to know. *New Phytologist* **149**: 154-158.
- Lipson DA, Scahdt CW, Schmidt SK, Monson RK. 1998.** Ectomycorrhizal transfer of amino acid-nitrogen to the alpine sedge *Kobresia myosuroides*. *New Phytologist* **142**: 163-167.

- Little WR, Bledsoe CS, Edmonds RL. 1984.** Nitrogen uptake and growth *in vitro* by *Hebeloma crustuliniforme* and other Pacific Northwest mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* **62**: 647-652.
- Lloyd Macgilp SA, Chambers SM, Dodd JC, Fitter AH, Walker C, Young JPW. 1996.** Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New phytologist* **133**:103-111.
- LoBuglio KF, Berbee ML, Taylor JW. 1996.** Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and other mycorrhizal fungi among the ascomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**: 287-294.
- LoBuglio KF, Rogers SO, Wang CJK. 1991.** Variation in ribosomal DNA among isolates of the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *Canadian Journal of Botany* **69**: 2331-2343.
- LoBuglio KF. 1998.** *Cenococcum*. In : Ectomycorrhizal fungi: Key genera profile. (Eds. JWG. Cairney, SM. Chambers) Springer, Berlin, Germany, 287-309.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, Hooper DU, Huston MA, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle DA. 2001.** Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* **294**: 804-808.
- Levitt J. 1972.** Responses of plant to environmental stresses. Academic, New York.
- Mac Arthur RH, Wilson EO. 1967.** *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, New Jersey, 437 p.
- Malloch DW, Pirozynski KA, Raven PH. 1980.** Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Science* **77**: 2113-2118.
- Mangin F, Bonaly R, Botton B, Martin F. 1986.** *Chemical composition of hyphal walls of the ectomycorrhizal fungus Cenococcum geophilum* In: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. (Eds. V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi). INRA, Paris, 451-456.
- Mantel N, Valand RS. 1970.** A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics* **26**: 547-558.
- Marshall JD, Perry DA. 1987.** Basal maintenance respiration of mycorrhizal and nonmycorrhizal root systems of conifers. *Canadian Journal Of Forest Research* **17**: 872-877.
- Martin F. 1991.** *Nuclear magnetic resonance studies in ectomycorrhizal fungi*. In *Methods in Microbiology Vol. 23, Techniques for the Study of Mycorrhiza*. (Eds JR Norris, DJ Read, AK Varma) Academic Press, London, United Kingdom, 121-148.

- Martin F, Canet D, Marchal JP. 1984.** *In vivo* natural abundance  $^{13}\text{C}$  NMR studies of the carbohydrate storage in ectomycorrhizal fungi. *Physiologie Végétale* **22**: 733-743.
- Martin F, Canet D, Marchal JP. 1985.**  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance study of mannitol cycle and trehalose synthesis during glucose utilisation by the ectomycorrhizal Ascomycete *Cenococcum graniforme*. *Plant Physiology* **77**: 499-502.
- Martin F, Canet D, Rolin D, Marchal JP, Larher F. 1983.** Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of polyphosphate metabolism in intact ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **71**: 469-476.
- Martin F, Delaruelle C, Hilbert JL. 1990.** An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research* **94**: 1059-1064.
- Martin F, Lorillou S. 1997.** *Nitrogen acquisition and assimilation in ectomycorrhizal systems. In Trees - contributions to modern tree physiology* (Eds. H. Rennenberg, W. Eschrich et H. Ziegler) Backhuys Publ., Leiden, Pays-bas, 423-439.
- Martin F, Marchal JP, Timinska A, Canet D. 1985.** The metabolism and physical state of polyphosphate in ectomycorrhizal fungi. A  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study. *New phytologist* **101**: 275-290.
- Martin F, Ramstedt M, Söderhäll K, Canet D. 1988.** Carbohydrate and amino acid metabolism in the ectomycorrhizal ascomycete *Sphaerospora brunnea* during glucose utilization. *Plant Physiology* **86**: 935-940.
- Martin F, Stewart GR, Genetet I, Mourot B. 1988.** The involvement of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonia assimilation by the rapidly growing ectomycorrhizal Ascomycete, *Cenococcum geophilum*. *New Phytologist* **110**: 541-550.
- Martin F. 1985.**  $^{15}\text{N}$ -NMR studies of nitrogen assimilation and amino acid biosynthesis in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*. *FEBS Letters* **182**: 350-354.
- Martin F. 1985.** *Contribution à l'étude du métabolisme primaire de symbiotes ectomycorhiziens.* Thèse de l'Université de Paris-Sud.
- Martin F. 2001.** Frontiers in molecular mycorrhizal research - genes, loci, dots and spins. *New Phytologist* **150**: 499-507.
- Mason PA, Ibrahim K, Ingleby K, Munro RC, Wilson. J. 1999.** Mycorrhizal development and growth of inoculated *Eucalyptus globulus* (Labill.) seedlings in wet and dry conditions in the glasshouse. *Forest Ecology and Management* **128**: 269-277.
- Massicotte HB, Trappe JM. 1992.** Studies on *Cenococcum geophilum*. II. Sclerotium morphology, germination, and formation in pure culture and growth pouches. *Canadian Journal of Botany* **70**: 125-132.

- Mejstrik VK, Krause HH. 1973.** Uptake of  $^{32}\text{P}$  by *Pinus radiata* roots inoculated with *Suillus luteus* and *Cenococcum graniforme* from different sources of available phosphate. *New Phytologist* **72**: 137-140.
- Melin E, Nilsson H. 1950.** Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiologia Plantarum* **3**: 88-92.
- Mexal J, Fisher JT, Osteryoung J, Reid CPP. 1975.** Oxygen availability in polyethyleneglycol solutions and its implications in plant-water relations. *Plant Physiology* **55**: 20-24.
- Mexal J, Reid CPP. 1973.** The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. *Canadian Journal of Botany* **51**: 1579-1588.
- Milgroom MG. 1996.** Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 457-477.
- Molina R, Massicotte A, Trappe JM. 1992.** Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: *Mycorrhizal Functioning* (ed. M.F. Allen). Chapman and Hall, London, UK, 357-423.
- Molina R, Trappe JM. 1982.** Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Science* **28**: 423-458.
- Morte A, Diaz G, Rodriguez P, Alarcon JJ, Sanchez-Blanco MJ. 2001.** Growth and water relations in mycorrhizal and non mycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biologia Plantarum* **44**: 263-267.
- Morte A, Lovisolo C, Schubert A. 2000.** Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavervyi*. *Mycorrhiza* **10**: 115-119.
- Mousain D. 1989.** *Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens*. Thèse d'état, Université de Montpellier II (U.S.T.L.), Montpellier, 234 p.
- Mousain D, Plassard C, Argillier C, Sardin T, Leprince F, El Karkouri K, Arvieu JC, Cleyet-Marel JC. 1994.** Strategy for the improvement of the quality of forest seedlings and mediterranean reforestation using controlled mycorrhizal infection in nurseries. *Acta Botanica Gallica* **141**: 571-580.
- Muhsin TM, Zwiazek JJ. 2001.** Ectomycorrhizas increase apoplastic transport and root hydraulic conductivity in *Ulmus americana* seedlings. *New Phytologist* **153**: 153-158.
- Nardini A, Salleo S, Tyree MT, Vertovec M. 2000.** Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. On hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Annals of Forest Science* **57**: 305-312.

- Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högnerng M, Högberg P. 1998.** Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* **392**: 914-916.
- Nehls U, Mikolajewski S, Magel E, Hampp R. 2001.** Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist* **150**: 533-541.
- Neves Machado MH. 1995.** *La mycorhization contrôlée d'Eucalyptus globulus au Portugal et l'effet de la sécheresse sur la symbiose ectomycorhizienne chez cette essence.* PhD thesis, Université de Nancy, France.
- Niederer M, Pankow W, Wiemken A. 1989.** Trehalose synthesis in mycorrhiza of Norway spruce: an indicator of vitality *European Journal of Forest Pathology* **19**: 14-20.
- Niehaus WG, Dilts RP. 1982.** Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Bacteriology* **151**: 243-250.
- Norby RJ, Jackson RB. 2000.** Root dynamics and global change: seeking an ecosystem perspective. *New Phytologist* **147**: 3-12.
- Nylund JE, Wallander H. 1992.** Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. *Methods in Microbiology* **24**: 77-88.
- Pachlewski R, Pachlewska J. 1974.** *Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (Pinus silvestris L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar.* Translated into english by R. Dzieciolowski. Forest Research Institute, Warsaw, Poland.
- Palmer JG, Hacskeylo E. 1970.** Ectomycorrhizal fungi in pure culture. I. Growth on single carbon sources. *Physiologia Plantarum* **23**: 1187-1197.
- Panaccione DG, Sheets NL, Miller SP, Cumming JR. 2001.** Diversity of *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine and non-serpentine soil. *Mycologia* **93**: 645-652.
- Paris F, Dexheimer J, Lapeyrie F. 1993.** Cytochemical evidence of a fungal cell wall alteration during infection of *Eucalyptus* roots by the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *Archives of Microbiology* **159**: 526-529.
- Parke JL, Linderman RG, and Black CH. 1983.** The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings. *New Phytologist* **95**: 83-95.
- Pavlicek A, Hrda S, Flegr J. 1999.** FreeTree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)* **45**, 97-99.

- Peter M, Ayer F, Egly S. 2001.** Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytologist* **149**: 311-325.
- Pigott CD. 1982a.** Fine structure of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr. on *Tilia cordata* Mill. *New Phytologist* **92**: 501-512.
- Pigott CD. 1982b.** Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr in dry soils. *New Phytologist* **92**: 513-517.
- Ponge JF. 1990.** Ecological study of a forest humus by observing a small volume. I. Penetration of Pine litter by mycorrhizal fungi. *European Journal of Forest Pathology* **20**: 290-303.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, De Nadal E, Arino J. 2000.** The transcriptional response of yeast to saline stress. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 17249-17255.
- Pugh GJF. 1980.** Strategies in fungal ecology. *Transactions of the British Mycological Society* **75**: 1-14.
- Ramstedt M, Jirjis R, Söderhäll K. 1987.** Metabolism of mannitol in mycorrhizal and non-mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **105**: 281-288.
- Ramstedt M. 1985.** Physiology of the ectomycorrhizal fungus *Piloderma croceum*, with special emphasis on mannitol metabolism. *Acta Univ. Upsaliensis Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science*.
- Raunkier C. 1905.** *Types biologiques pour la géographie botanique*. Kun. Dansk Vid. Selsk. **1905**: 347-348.
- Ray PM, Green PB, Cleland R. 1972.** Role of turgor in plant cell growth. *Nature* **239**: 163-164.
- Read DJ. 1991.** Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**: 376-390.
- Read DJ. 2000.** Links between genetic and functional diversity - a bridge too far? *New Phytologist* **145**: 363-365.
- Read DJ, Haselwandter K. 1981.** Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytologist* **88**: 341-352.
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ, Bruns TD. 2001.** Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology* **10**: 1025-1034.
- Rogers SO, Yan ZH, Shinohara ML, LoBuglio KF, Wang CJK. 1993.** Messenger RNA intron in the nuclear 18s ribosomal RNA gene of deuteromycetes. *Current Genetics* **23**: 338-342.

- Ruiz-Lozano JM , Azcon R. 1995.** Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plant as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum* **95**: 472-478.
- Safir GR, Boyer JS, Gerdemann JW. 1971.** Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science* **172**: 581-583.
- Sanders IR. 1999.** No sex please, we're fungi. *Nature* **399**: 737-739.
- Schmidt O, Moreth U. 2000.** Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans*. *Mycological Research* **104**: 69-72.
- Selosse MA, Jacquot D, Bouchard D, Martin F, Le Tacon F. 1998.** Temporal persistence and spatial distribution of strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Molecular Ecology* **7**: 561-573.
- Selosse MA, Le Tacon F. 1995.** Les associations mutualistes entre champignons et phototrophes : leur diversité et leur rôle dans la colonisation du milieu terrestre. *Cryptogamies (Mycologie)* **16**: 1-43.
- Selosse MA, Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 15-20.
- Selosse MA. 1998.** Etude de populations de champignons Basidiomycètes ectomycorhiziens du genre *Laccaria*, introduits ou spontanés sous Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Thèse de l'Université Paris XI Orsay.
- Shannon CE, Weaver W. 1949.** *The mathematical theory of communication*. Urbana, USA: University of Illinois Press.
- Shinohara ML, LoBuglio KF, Rogers SO. 1996.** Group-I intron family in the nuclear ribosomal RNA small subunit genes of *Cenococcum geophilum* isolates. *Current Genetics* **29**: 377-387.
- Shinohara ML, LoBuglio KF, Rogers SO. 1999.** Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*. *Current Genetics* **35**: 527-535.
- Shinohara ML. 1994.** *Molecular evolutionnary study of Cenococcum geophilum*. PhD thesis, State University of New York, College of Environmental Science and Forestry, Syracuse, NY.
- Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997.** Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* **388**: 579-582.
- Singh M, Scrutton NS, Scrutton MC. 1988.** NADPH generation in *Aspergillus nidulans*: is the mannitol cycle involved? *Journal of General Microbiology* **134**, 643-654.

- Slankis V. 1973.** *Hormonal relationship in mycorrhizal development.* In: Ectomycorrhiza; their ecology and physiology. (Eds. GC. Marks, TT. Kozlowski) Academic Press, New York, pp 231-298.
- Smith SE, Read DJ. 1997.** *Mycorrhizal symbiosis* (second edition). Academic Press, London, UK. 605 p.
- Söderström B. 1992.** The ecological potential of the ectomycorrhizal mycelium. In Eds DJ Read, DH Lewis, AH Fitter, IJ Alexander, *Mycorrhizas in Ecosystems*. Wallingford, UK: CAB International, 77-83.
- Stoop JMH, Williamson JD, Mason Pharr D. 1996.** Mannitol in plants: a method for coping with stress. *Trends in plant science*. **5**: 139-144.
- Stülten CH, Kong FX, Hampp R. 1995.** Isolation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum*. *Mycorrhiza* **5**: 259-266.
- Subramanian KS, Charest C, Dwyer LM, Hamilton RI. 1995.** Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasseling. *New Phytologist* **129**: 643-650.
- Swire-Clark GA, Marcotte Jr WR. 1999.** The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology* **39**: 117-128.
- Swofford DL. 1999.** *PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), Version 4.08b8*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Taylor AFS, Martin F, Read DJ. 2000.** Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica* L.) along North-South transects in Europe. In: Ed Schulze ED, *Carbon and Nitrogen Cycling in European Forest Ecosystems*. Berlin Heidelberg, Springer Verlag, Ecological Studies, **142**: 343-365.
- Taylor DL, Bruns TD. 1999.** Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* **8**: 1837-1850.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC. 1999.** The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 197-246.
- Theodorou C. 1978.** Soil moisture and the mycorrhizal association of *Pinus radiata* D. *Soil Biology and Biochemistry* **10**: 33-37.
- Timonen S, Tammi H, Sen R. 1997.** Characterization of the host genotype and fungal diversity in Scots pine ectomycorrhiza from natural humus microcosms using isozyme and PCR-RFLP analyses. *New Phytologist* **135**: 313-323.

- Trappe J.M. 1971.** *Mycorrhiza-forming Ascomycetes*. In: *Mycorrhizae: proceedings of the first North American Conference on mycorrhizae*. (Eds. E. Hacskeylo). USDA Forest Service, Misc Publ 1189.
- Trappe J.M. 1962.** *Cenococcum graniforme - its distribution, ecology, mycorrhiza and inherent variation*. PhD Dissertation, University of Washington, Seattle, Washington.
- Trappe J.M. 1979.** The orders, families, and genera of hypogeous ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon* **9**: 297-340.
- Trappe J.M. 1988.** Lessons from alpine fungi. *Mycologia* **80**: 1-10.
- Treseder K.K., Allen M.F. 2000.** Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen deposition. *New Phytologist* **147**: 189-200.
- Unestam T., Sun Y.P. 1995.** Extramatrical structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **5**: 301-311.
- Visser S. 1995.** Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* **129**: 389-401.
- Vogt K.A., Edmonds R.I., Grier C.C. 1981.** Dynamics of ectomycorrhizae in *Abies amabilis* stands: the role of *Cenococcum graniforme*. *Holarctic Ecologia* **4**: 167-173.
- Vogt K.A., Grier C.C., Meier C.E., Edmonds R.L. 1982.** Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystems in western Washington; *Ecology* **63**: 370-380.
- Voiry H. 1981.** Classification morphologique des ectomycorhizes du chêne et du hêtre dans le nord-est de la France. *European Journal of forest Pathology* **11**: 284-299.
- Vralstad T., Schumacher T., Taylor A.F.S. 2002.** Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts. *New Phytologist* **153**: 143-152.
- Wartinger A.M., Burlett M., Guehl J.M., Garbaye J. 1994.** *Contribution of Laccaria laccata ectomycorrhizas to osmotic adjustment of Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) under drought stress*. Comptes-rendu du Quatrième Symposium Européen sur les Mycorhizes, Grenade, Spain. 213 p.
- Weete J.D. 1974.** *Fungal lipid biochemistry: distribution and metabolism*. New York: Plenum press.
- Welch D.M., Meselson M. 2000.** Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* **288**: 1211-1215.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. New York, USA: Academic Press, 315-322.
- Wilcox HE, Wang CJK. 1987a.** Mycorrhizal and pathological associations of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings. *Canadian journal of Forest Research* **17**: 884-899.
- Wilcox HE, Wang CJK. 1987b.** Ectomycorrhizal and ectendomycorrhizal associations of *Phialophora finlandia* with *Pinus resinosa*, *Picea rubens*, and *Betula alleghaniensis*. *Canadian journal of Forest Research* **17**: 976-990.
- Wolff K, El-Akkad S, Abbott RJ. 1997.** Population substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai desert, in relation to its pollinator behaviour. *Molecular Ecology* **6**: 365-372.
- Wright S. 1943.** Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114-138.
- Zeigler RS, Scott RP, Leung H, Bordeos AA, Kumar J, Nelson RJ. 1997.** Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology* **87**: 284-294.
- Zhou ZH, Miwa M, Matsuda Y, Hogetsu T. 2001.** Spatial distribution of the subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei* genets. *Journal Of Plant Research* **114**: 179-185.

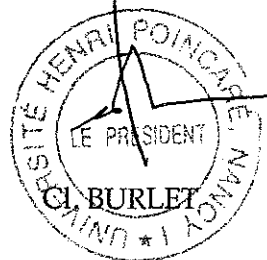
Monsieur JANY Jean-Luc

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER  
*Burlet n° 660*

Nancy, le *2 avril 2002*

Le Président de l'Université



## Résumé

Parmi les centaines d'espèces du cortège ectomycorhizien de la hêtraie Lorraine on trouve un ascomycète asexué, *Cenococcum geophilum*, qui présente des caractéristiques reconnues de résistance au stress hydrique.

L'utilisation de techniques moléculaires a révélé une forte variabilité génétique au sein de cinq populations de *C. geophilum*. Cette variabilité, sous l'action de facteurs écogéographiques et de limitation des flux de gènes, conduit à une différenciation des populations.

Des mesures d'activité respiratoire d'ectomycorhizes prélevées *in situ*, pendant deux saisons de végétation, montrent que, lorsque le potentiel hydrique du sol est inférieur à -0,2 MPa, les ectomycorhizes de *C. geophilum* ont une activité physiologique supérieure à celle des ectomycorhizes du type Lactaire qui dominent numériquement. *C. geophilum* préserve donc mieux que le type Lactaire l'intégrité physiologique des racines en conditions hydriques limitantes.

Des analyses *in vitro* n'ont pas mis en évidence de déterminisme métabolique à cette résistance. Elles n'ont pas non plus établi de lien entre résistance au stress hydrique et génotype de *C. geophilum*.

*Mots-clefs* : hêtraie ; *C. geophilum* ; ectomycorhize ; populations ; diversité ; activité

## Abstract

The asexual ascomycete *Cenococcum geophilum*, known for its drought resistance, is a prominent fungus within the ectomycorrhizal communities in the beech forests in northeastern France.

A high level of genetic diversity between- and within- *C. geophilum* populations was observed. This result suggests the occurrence of a high rate of mitotic or meiotic recombinations and an effect of stand features on population structure.

We compared respiration activities of *C. geophilum* and *Lactarius*-type ectomycorrhizas sampled from beech stands, during two growing seasons. When soil water potential is lower than -0.2 MPa, the respiration activity of *C. geophilum* ectomycorrhizas is significantly less altered than that of *Lactarius*-type ectomycorrhizas. Therefore, *C. geophilum* preserves the physiological integrity of beech root facing drought stress.

*In vitro* tests did not reveal any metabolic effects which could explain the drought resistance of *C. geophilum*. In addition, no links between *C. geophilum* genotype and *in vitro* physiological behaviour were detected.

*Keywords* : beech forest ; *C. geophilum* ; ectomycorrhiza ; populations ; diversity ; activity